

Immunoblotuntersuchungen von spezifischen IgE- und IgG4-Antikörpern vor und während einer spezifischen Immuntherapie bei Bienen- und Wespengiftallergikern

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena
von

Thekla Renker

geboren am 22.05.1976 in Erfurt

Gutachter:

1. Prof. Dr. P. Elsner, Jena
2. PD Dr. U. Markert, Jena
3. Prof. Dr. U. Wollina, Dresden

Tag der öffentlichen
Verteidigung:

01.03.2010

Abkürzungsverzeichnis

APZ	antigenpräsentierende Zelle
CD	Cluster of Differentiation
IL	Interleukin
INF- γ	Interferon γ
IgG	Immunglobulin G
IgG4	Immunglobulin G4
IgE	Immunglobulin E
kDa	Kilodalton
RAST	Radio-Allergo-Sorbent-Test
SDS	<i>engl.</i> sodium-dodecyl-sulfate (<i>deutsch</i> natrium-dodecyl-sulfat)
slg	spezifisches Immunglobulin
slgG4	spezifisches Immunglobulin G4
slgE	spezifisches Immunglobulin E
SIT	spezifische Immuntherapie
TGF	Transforming Growth Factor (<i>deutsch</i> transformierender Wachstumsfaktor)
Tregs	T-regulatorische Zellen

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	1
2	Einleitung	3
2.1	Allgemeines	3
2.2	Hymenopterengifte	4
2.3	Pathogenese der Allergie	6
2.4	Klinische Symptome einer Hymenopterenallergie	8
2.5	Diagnostik	10
2.5.1	Immunoblot	12
2.5.2	Zukunftsperspektiven	13
2.6	Therapie der Hymenopterenallergie	14
2.6.1	Allgemeine Maßnahmen.....	14
2.6.2	Die spezifische Immuntherapie	14
2.6.3	Zukunftsperspektiven	16
3	Ziele der Arbeit	18
4	Methodik	19
4.1	Patientenkollektiv	19
4.2	Material und Methoden.....	20
4.2.1	Hyposensibilisierungstherapie.....	20
4.2.2	IgE- und IgG4-Bestimmung	20
4.2.3	Statistische Auswertung	23
5	Ergebnisse.....	24
5.1	Das Verhalten des sIgE vor und während der spezifischen Immuntherapie	24
5.1.1	Bienengiftallergiker – Bande 18 kDa (Phospholipase A2).....	24
5.1.2	Bienengiftallergiker – Bande 44 kDa (Hyaluronidase)	25
5.1.3	Bienengiftallergiker – Bande 100 kDa (Allergen C).....	25
5.1.4	Wespengiftallergiker – Bande 23 kDa (Antigen 5)	26
5.1.5	Wespengiftallergiker – Bande 35 kDa (Phospholipase A1).....	27
5.1.6	Wespengiftallergiker – Bande 44 kDa (Hyaluronidase).....	28
5.2	Das Verhalten des sIgG4 vor und während der spezifischen Immuntherapie	30
5.2.1	Bienengiftallergiker – Bande 18 kDa (Phospholipase A2).....	30
5.2.2	Bienengiftallergiker – Bande 44 kDa (Hyaluronidase)	31
5.2.3	Bienengiftallergiker – Bande 100 kDa (Allergen C).....	31
5.2.4	Wespengiftallergiker – Bande 23 kDa (Antigen 5)	32
5.2.5	Wespengiftallergiker – Bande 35 kDa (Phospholipase A1).....	33
5.2.6	Wespengiftallergiker – Bande 44 kDa (Hyaluronidase).....	34
5.3	Verhältnis IgE/IgG4 vor und nach 3 Jahren spezifischer Immuntherapie	35
5.3.1	Bienengiftallergiker – Bande 18 kDa (Phospholipase A2).....	35
5.3.2	Bienengiftallergiker – Bande 44 kDa (Hyaluronidase)	36
5.3.3	Bienengiftallergiker – Bande 100 kDa (Allergen C).....	36
5.3.4	Wespengiftallergiker – Bande 23 kDa (Antigen 5)	36
5.3.5	Wespengiftallergiker – Bande 35 kDa (Phospholipase A1).....	37
5.3.6	Wespengiftallergiker – Bande 44 kDa (Hyaluronidase).....	37
5.4	Spezielle Betrachtung der Patienten mit einem erfolgten Feldstich hinsichtlich der Verläufe der spezifischen Immunglobuline E und G4	37
5.4.1	Patienten mit Bienenstich.....	38
5.4.2	Patienten mit Wespenstich.....	45

6	Diskussion.....	49
6.1	Das Verhalten von sIgE vor und während der spezifischen Immuntherapie	49
6.2	Das Verhalten von sIgG4 vor und während der spezifischen Immuntherapie	51
6.3	Verhältnis IgE/IgG4 vor und nach 3 Jahren spezifischer Immuntherapie.....	54
7	Schlussfolgerungen.....	59
8	Literatur- und Quellenverzeichnis	61
9	Anhang	65
9.1	Danksagung.....	65
9.2	Ehrenwörtliche Erklärung	66

1 Zusammenfassung

Es wird geschätzt, dass zwischen 0.3% und 7.5% der Allgemeinbevölkerung an potentiell lebensbedrohlichen systemischen Reaktionen nach Insektenstich leiden (Bilo et al. 2005). Der diagnostische work-up einer Hymenopterenallergie sowie die Behandlung mittels spezifischer Immuntherapie ist mittlerweile etabliert und in den Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAI) (Przybilla et al. 2004) ausführlich dargelegt. Während jedoch die klinische Wirksamkeit der SIT in zahlreichen Studien belegt werden konnte (Reisman 1993; Golden et al. 1996, Lerch und Müller 1998), sind die der Immuntherapie zugrundeliegenden immunologischen Mechanismen bisher noch nicht vollständig geklärt. Gemäss derzeitigem Wissensstand verknüpft man eine erfolgreiche SIT mit Veränderungen der allergenspezifischen T-Zellen, einer Reduktion der Mastzellen und Basophilen und einer verminderten Freisetzung von Mediatoren sowie einem moderaten Abfall der Serumkonzentrationen von spezifischem IgE begleitet von einer Erhöhung der Serumkonzentrationen der (allergenblockierenden) IgG-Antikörper, insbesondere der IgG4-Klasse. Für das Monitoring einer erfolgreichen SIT gibt es derzeit jedoch noch keinen verlässlichen Parameter.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, zu untersuchen, ob anhand der Verläufe der Serumkonzentrationen der spezifischen Immunglobuline (sIgE und sIgG4) gegen die Einzelallergene des Insektengiftes, Aussagen über die Wirksamkeit der SIT bzw. das Outcome eines Feldstiches gemacht werden können. Dazu wurden die Seren von insgesamt 41 Patienten, welche aufgrund einer Bienen- und/oder Wespengiftallergie in der Allergieabteilung des Universitätsspitals Zürich behandelt wurden, untersucht. Die entsprechenden Immunoblotuntersuchungen für bienen- und wespengiftspezifisches IgE und IgG4 wurden mit den AlaBLOT®-Allergenstreifen und den dazugehörigen Reagenzien der Firma DPC Biemann (Diagnostic Products Corporation-Biemann, Bad Nauheim, Deutschland) durchgeführt. Die semiquantitative Auswertung der Westernblots erfolgte mit der Software Quantiscan (Biosoft, Cambridge, UK). Von jedem Patienten wurden 3 Seren (vor Beginn der SIT, nach 3 Monaten und nach 3 Jahren SIT) unter Verwendung des AlaBLOT® getestet.

Während der SIT konnte bei den Bienengiftallergikern eine signifikante Abnahme des sIgE gegen die 2 Hauptallergene Phospholipase A2 und Hyaluronidase im Verlauf von 3 Jahren beobachtet werden. Dagegen kam es bei den Wespengiftallergikern lediglich für das Antigen 5 zu einem signifikanten Abfall über die 3 beobachteten Jahre, während die Veränderungen für die anderen beiden Hauptallergene (Phospholipase A1 und Hyaluronidase) nicht signifikant waren.

Bezüglich der sIgG4-Werte konnten sowohl bei den Bienen- als auch bei Wespengiftallergikern für alle Allergene ein signifikanter Anstieg innerhalb der beobachteten 3 Jahre gemessen werden. Beim Vergleich der Patienten, welche einen Feldstich während der SIT oder nach Abschluss dieser erlitten und tolerierten und denen, welche einen Feldstich nicht tolerierten, konnten keine Unterschiede hinsichtlich der Verläufe sowohl des sIgE's als auch des sIgG4's festgestellt werden. Hinsichtlich des Verhältnisses sIgE/sIgG4 konnte bei der Mehrzahl der Patienten eine Abnahme über den beobachteten Zeitraum verzeichnet werden. Somit wären gemäss der Aussage, dass „geschützte“ Patienten nach 3 Jahren SIT ein Verhältnis sIgE/sIgG4 <1 aufweisen, die Mehrzahl aller Patienten geschützt. Aber auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten mit einem tolerierten Feldstich und den Patienten mit nicht toleriertem Feldstich festgestellt werden. Die Aussagen, dass „geschützte“ Patienten nach 3 Jahren SIT zumindest gegen all jene Allergenbanden eine sIgG4-Reaktivität aufweisen, die vor Therapie sIgE-positiv war, und dass „nicht geschützte“ Patienten nach 3 Jahren SIT einen isolierten Mangel an sIgG4-Reaktivität bei einer beliebigen Allergenbande aufweisen, die vor Therapiebeginn sIgE-positiv war, konnte durch unsere Untersuchungen weitestgehend bestätigt werden.

Insgesamt kommen wir, ähnlich wie auch andere Autoren, zu dem Schluss, dass die semiquantitativen Messungen der sIgE- und sIgG4-Antikörper zur Beurteilung des Erfolges einer SIT hilfreich, aber nicht ausreichend sind. In Bezug auf die Verläufe sIgE/sIgG4 haben sich die Unterscheidungsparameter „geschützt“ und „nicht geschützt“ zwar als treffsicher erwiesen, eine eindeutige Antwort, ob anhand dieser Unterscheidungsparameter eine Aussage über den Erfolg einer SIT oder das Outcome eines Sticherereignisses gemacht werden kann, ist aufgrund der kleinen Fallzahlen der Patienten mit Stichereignis nicht möglich.

Neuere Studien postulieren, dass neben den quantitativen Veränderungen des spezifischen IgG4 vielmehr auch qualitative Veränderungen im Sinne von Änderungen in der Spezifität und Affinität des sIgG4 sowie Effekte auf die antigen-präsentierenden Zellen eine entscheidende Rolle im Mechanismus einer erfolgreichen SIT spielen. Somit muss in Zukunft vielleicht das Augenmerk eher auf die Messung der „funktionellen“ Veränderungen der Antikörper als auf die Messung der Antikörperlevel gerichtet werden, hinsichtlich der Frage nach Therapieerfolg.

Vor dem Hintergrund der rekombinanten Allergene können Immunblotuntersuchungen in Zukunft vielleicht sinnvoller eingesetzt werden, um das entsprechende Sensibilisierungsprofil eines einzelnen Patienten vor SIT zu bestimmen und die Behandlung mit den entsprechenden Einzelallergenen entsprechend dem Auftreten sIgE und sIgG4 im Verlauf einer SIT anzupassen, als für Aussagen hinsichtlich klinischer Reaktionslage des Patienten und Outcome eines Sticherereignisses.

2 Einleitung

2.1 Allgemeines

Zahlreiche Insektenarten können beim Menschen örtliche und systemische Stichreaktionen auslösen. In Deutschland werden systemische Reaktionen ganz überwiegend durch Honigbienen (*Apis mellifera*; im Folgenden als Biene bezeichnet) oder bestimmte Faltenwespen (*Vespula vulgaris*, *Vespula germanica*; im Folgenden als Wespe bezeichnet) verursacht. Selten führen auch andere Hymenopterenarten wie Hummeln (*Bombus* spp.), Hornissen (*Vespa crabro*), *Dolichovespula* spp. oder Ameisen (*Formicidae*), in Einzelfällen auch andere Insekten wie Mücken oder Bremsen zu systemischen Reaktionen (Przybilla et al. 2004). Zur Taxonomie der Hymenopteren vgl. Abbildung 1.

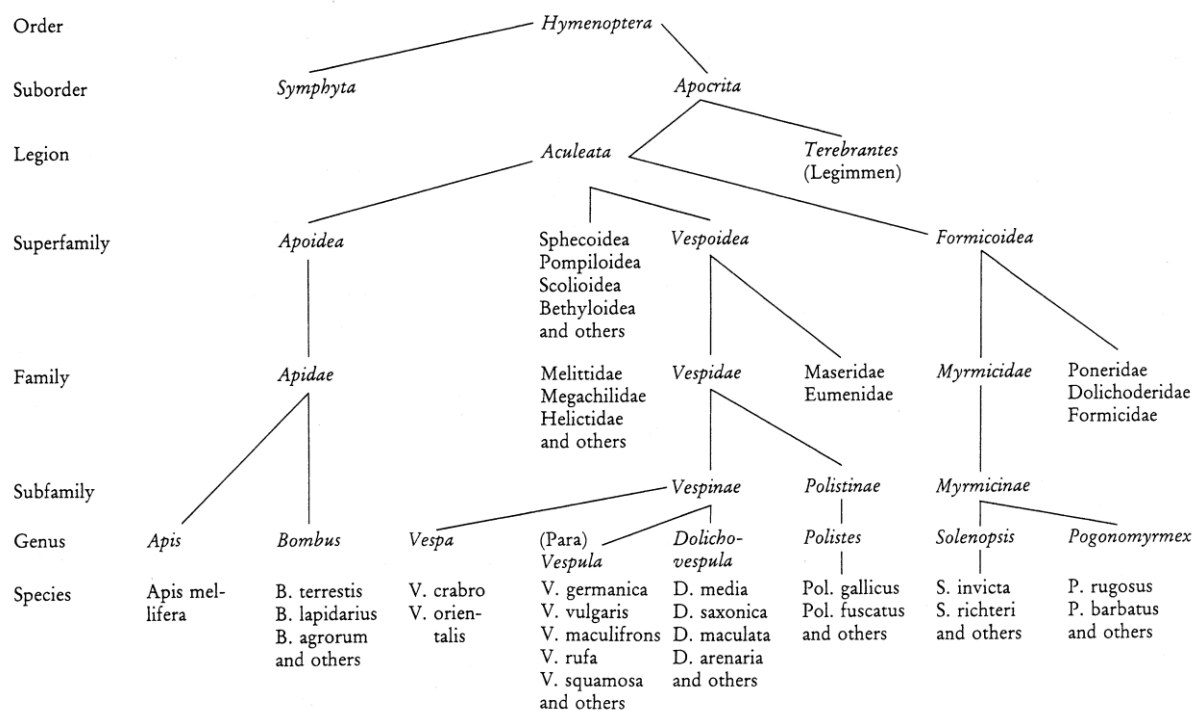


Abbildung 1 Taxonomie der Hymenopteren (aus Müller 1990)

Die Bienen bilden grosse, mehrjährige Völker mit bis zu 40.000 Arbeiterinnen. Die Flugzeit der Bienen erstreckt sich von Ende Februar bis Oktober. Da Bienen überwintern, können sie auch während des Winters an warmen Tagen zahlreich ausschwärmen.

Bei den Wespen überwintern nur die begatteten Jungköniginnen. In einem geeigneten Versteck überstehen sie den Winter schlafend in einer Winterstarre. Im Frühjahr beginnen sie mit dem Nestbau und gründen anschliessend einen neuen Staat. Mit Wespenstichen ist somit erst im Hochsommer und Herbst zu rechnen.

Nur die weiblichen Hymenopteren stechen, da nur sie einen Stachel besitzen. Der Giftstachel ist evolutionsgeschichtlich (phylogenetisch) aus einem ursprünglichen Legebohrer (Ovipositor) entstanden. Im Laufe der Zeit hat sich daraus ein Wehrstachel mit anhängender Giftdrüse entwickelt, um kleinere Lebewesen/Beutetiere zu lähmen und zu töten. Bei einem Bienenstich werden ca. 50-100 µg Gift (bezogen auf die Trockensubstanz) injiziert. Ein Insekt der Gattung *Vespula* oder *Dolichovespula* gibt pro Stich etwa 3-10 µg Gift ab.

Die Bienenstachel sind mit Widerhaken besetzt, so dass sie zumeist in der Haut der Opfer stecken bleiben; die Biene selbst stirbt nach 2-3 Tagen. Die Stachel der Wespen besitzen keine Widerhaken, weshalb die Wespen ihren Stachel wieder zurückziehen können und zu mehreren Stichen fähig sind. Da es hiervon nicht ganz selten Ausnahmen gibt, kann der Verbleib des Stechapparates in der Wunde nicht zur sicheren Unterscheidung des verursachenden Insektes herangezogen werden.

2.2 Hymenopterengifte

Hymenopterengifte sind komplex zusammengesetzt, sie enthalten niedermolekulare Verbindungen (vor allem biogene Amine), basische Peptide und höhermolekulare Proteine. Vom immunologischen Gesichtspunkt her sind die höhermolekularen Proteine interessant, da diese vor allem zur allergischen Sensibilisierung führen; es sind meist Enzyme wie Phospholipasen, Hyaluronidasen und Phosphatasen. Ausnahmsweise können Peptide wie das Mellitin, aufgrund ihrer Tendenz Polymere zu bilden, IgE-Antikörper induzieren. Für die lokale toxische Reaktion und die Schmerzwirkung sind in erster Linie die Peptide und biogenen Amine verantwortlich. Die meist stark basischen Peptide Mellitin, Apamin und Kinine führen zusammen mit den Phospholipasen zu zytotoxischen, hämolytischen und neurotoxischen Schäden. Die niedermolekularen Substanzen (v.a. die biogenen Amine wie das Histamin) fördern durch ihre vasodilatatorische und permeabilitätssteigernde Wirkung die rasche Verbreitung des Giftes im Gewebe. Unterstützung erhalten sie hierbei durch das Enzym Hyaluronidase (Przybilla 1995).

Gewisse Unterschiede in der Zusammensetzung der Hymenopterengifte können sich in Abhängigkeit von der Entwicklung des Insektes und von seinen äusseren Lebensbedingungen ergeben (Przybilla und Ruëff 1999).

Unterscheiden kann man zwischen Major- und Minor-Allergenen. Major-Allergene sind Allergene, gegen die bei mehr als 50% der Patienten spezifische IgE-Antikörper nachgewiesen werden können. Entsprechend können Minor-Allergene nur bei unter 50% der Sensibilisierten nachgewiesen werden.

Für fast 90% der Patienten mit Bienengiftallergie stellt die Phospholipase A₂ (Molekulargewicht von 15-20 kDa), eines der 5 wesentlichen Allergene des Bienengiftes, das Major-Allergen dar. Als weitere Allergene des Bienengiftes sind vor allem Hyaluronidase (Molekulargewicht von 43-45 kDa) und saure Phosphatase (Molekulargewicht von 49 kDa), ferner das Allergen C (Molekulargewicht von 105 kDa) und in geringerem Maße auch Mellitin (Molekulargewicht von 2.8-2.9 kDa) von Bedeutung (Müller 1990, Przybilla und Ruëff 1999, Bilò et al. 2005).

Die Giftzusammensetzung der verschiedenen Wespenarten ist grundsätzlich ähnlich, jedoch können im Einzelnen aber nicht nur quantitative, sondern auch qualitative Unterschiede gefunden werden.

Die wesentlichen Allergene (Major-Allergene) sind hier Phospholipase A₁ (Molekulargewicht von 33-37 kDa), Hyaluronidase (Molekulargewicht von 41-46 kDa) und Antigen 5 (Molekulargewicht von 22-27 kDa), daneben wurden auch andere Inhaltsstoffe (z.B. saure und alkalische Phosphatase und Protease) als Allergene (Minor-Allergene) beschrieben (Przybilla 1995, Reimers und Müller 2002, Bilò et al. 2005). Zur Zusammensetzung von Bienen- und Wespengift siehe auch Tabelle 1.

	Anteil	Biene	Wespe
Niedermolekulare Substanzen	20-25%		
Biogene Amine Histamin, Katecholamine		+	+
Acetylcholine, Serotonin		-	+
Aminosäuren, Oligopeptide		++	++
Karbohydrate, Phospholipide		+	+
Peptide	50-60%	Mellitin (Api m 4) Apamin MCD-Peptide Tertiapin Secapin	Kinine Mastoparan Hämolyisin
Eiweiße	15-30%	Phospholipase A ₂ (Api m 1) Hyaluronidase (Api m 2) saure Phosphatase (Api m 3) Allergen C	Phospholipase A ₁ (Ves v 1) Hyaluronidase (Ves v 2) Antigen 5 (Ves v 3) Phosphatase Protease

Tabelle 1 Zusammensetzung von Bienen- und Wespengift

Bei vielen Patienten mit Insektengift-Allergie werden Sensibilisierungen gegen mehrere Insektengifte beobachtet. Diese können auf einer Mehrfachsensibilisierung oder auf einer Kreuzreaktion zwischen den verschiedenen Giften beruhen. Wichtig ist die Unterscheidung für die Auswahl des Insektengiftes zur Durchführung der SIT. Liegt eine Kreuzreaktivität vor, muss nur mit dem Gift der primären Sensibilisierung, bei einer Mehrfachsensibilisierung jedoch mit mehreren Giften behandelt werden. Eine ausgeprägte Kreuzreaktivität besteht zwischen den Giften der verschiedenen Wespenarten und der Hornisse, sowie zwischen denjenigen von Biene und Hummel. Zwischen Bienen- und Wespengift ist die Kreuzreaktivität dagegen gering und weitgehend auf die Hyaluronidase beschränkt (Reimers und Müller 2002)

2.3 Pathogenese der Allergie

Der Begriff der Allergie wurde 1906 von Freiherr Clemens von Pirquet, einem Wiener Kinderarzt geprägt (v. Pirquet 1906). Pirquet definierte damals eine Allergie als „veränderte Fähigkeit des Körpers auf eine fremde Substanz zu reagieren“. Pirquet erkannte als erster, dass Antikörper nicht nur schützende Immunantworten vermitteln, sondern auch Überempfindlichkeitsreaktionen auslösen können. Heute beschreibt der Begriff Allergie eine erworbene spezifische Änderung der Reaktionsfähigkeit des Organismus gegenüber einer körperfremden Substanz infolge einer immunologischen Reaktion.

Die Allergie wurde erstmalig 1963 von Coombs und Gell nach ihren pathophysiologischen Mechanismen in 4 Typen eingeteilt:

- Typ I, Reaktion vom Sofort Typ, IgE-vermittelt
- Typ II, Reaktion vom zytotoxischen Typ
- Typ III, Reaktion vom Immunkomplex-Typ
- Typ IV, Reaktion vom Spättyp, zellvermittelt

Die Bienen- und Wesengiftallergie gehört zur Gruppe der Typ I Reaktion.

Der Kontakt mit (Insektengift)-Allergenen kann zu einer Sensibilisierung führen, wobei antigenpräsentierende Zellen, immunkompetente B-Zellen und T-Helferzellen kooperieren. In der Sensibilisierungsphase werden in den Körper gelangte Allergene von den antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen und prozessiert. Die aktivierten antigenpräsentierenden Zellen präsentieren über ihre Histokompatibilitätskomplex-II-Oberflächenrezeptoren (MHC-II = major histocompatibility complex) Allergenbruchstücke an naive T-Zellen. Die naiven T-Zellen können das Antigen auf der Zelloberfläche mit ihren T-Zell-Rezeptoren (TZR) erkennen. Das Binden des TZR an den MHC-II-Komplex bildet das erste Signal zur Aktivierung der ruhenden T-Zelle. Eine IL-4-reiche Umgebung fördert dabei den

Switch der ruhenden T-Zelle hin zur Th2-Zelle. Diese bewirkt durch Sezernierung von IL-4 und IL-13 einen Isotypenklassenwechsel in B-Zellen hin zur IgE-Produktion. Um IgE sezernieren zu können, bedarf es einer weiteren Interaktion zwischen B- und T-Zelle; durch die Bindung des B-Zell-Oberflächenproteins CD40 an den zellgebundenen CD40-Liganden der T-Zelle wird die B-Zelle zur IgE-sezernierenden Plasmazelle transformiert. (Röver 2001, Akdis und Akdis 2007, Bohle 2008).

IgE-Antikörper haben eine sehr hohe Affinität zu ihren zellgebundenen Rezeptoren, dem FcεRI und FcεRII Rezeptor. Hierbei verfügt der hauptsächlich an Mastzellen und Basophilen vorkommende FcεRI Rezeptor über eine wesentlich höhere Affinität zu IgE.

Sowohl IgE-Antikörper als auch der hochaffine IgE-Rezeptoren FcεRI kommen nur monomer vor. Dies und die Tatsache, dass eine allergische Reaktion der Vernetzung oberflächen-gebundenen IgEs bedarf, sichert die hohe Spezifität der IgE-vermittelten allergischen Reaktion.

Bei erneutem Allergenkontakt (Effektorphase) führt die Überbrückung von mindestens 2 benachbarten, zellfixierten allergenspezifischen IgE-Molekülen durch ein wenigstens divalentes Allergen zur Aktivierung von Signalkaskaden in der Mastzelle, an deren Ende die Freisetzung verschiedener Entzündungsmediatoren steht. Hierzu zählen zum einen Histamin und Metabolite der Arachidonsäure (z.B. Leukotriene, Prostaglandine). Diese Substanzen führen zu einer Kontraktion der glatten Muskulatur, zur Stimulation kutaner Nervenendigungen, zu Vasodilatation und Gefäßpermeabilitätsstörungen im Kapillarbereich. Damit verursachen sie Allergiesymptome wie Juckreiz oder das Auftreten von Urticae und Gesichtsschwellungen. Auch die Genese des anaphylaktischen Schocks lässt sich hiermit erklären. Neben Histamin und Arachidonsäuremetaboliten setzen Mastzellen während allergischer Reaktionen u.a. IL-4 frei, was zu einer Aktivierung von Th2-Zellen führt. Diese sezernieren ihrerseits IL-4, IL-5 und IL-13 und aktivieren damit eosinophile und basophile Granulozyten. Diese werden neben Makrophagen zusätzlich durch chemotaktische Faktoren der Mastzellen angelockt (Müller 1989, Müller 1990, Röver 2001, Akdis und Akdis 2007). Siehe dazu auch Abbildung 2.

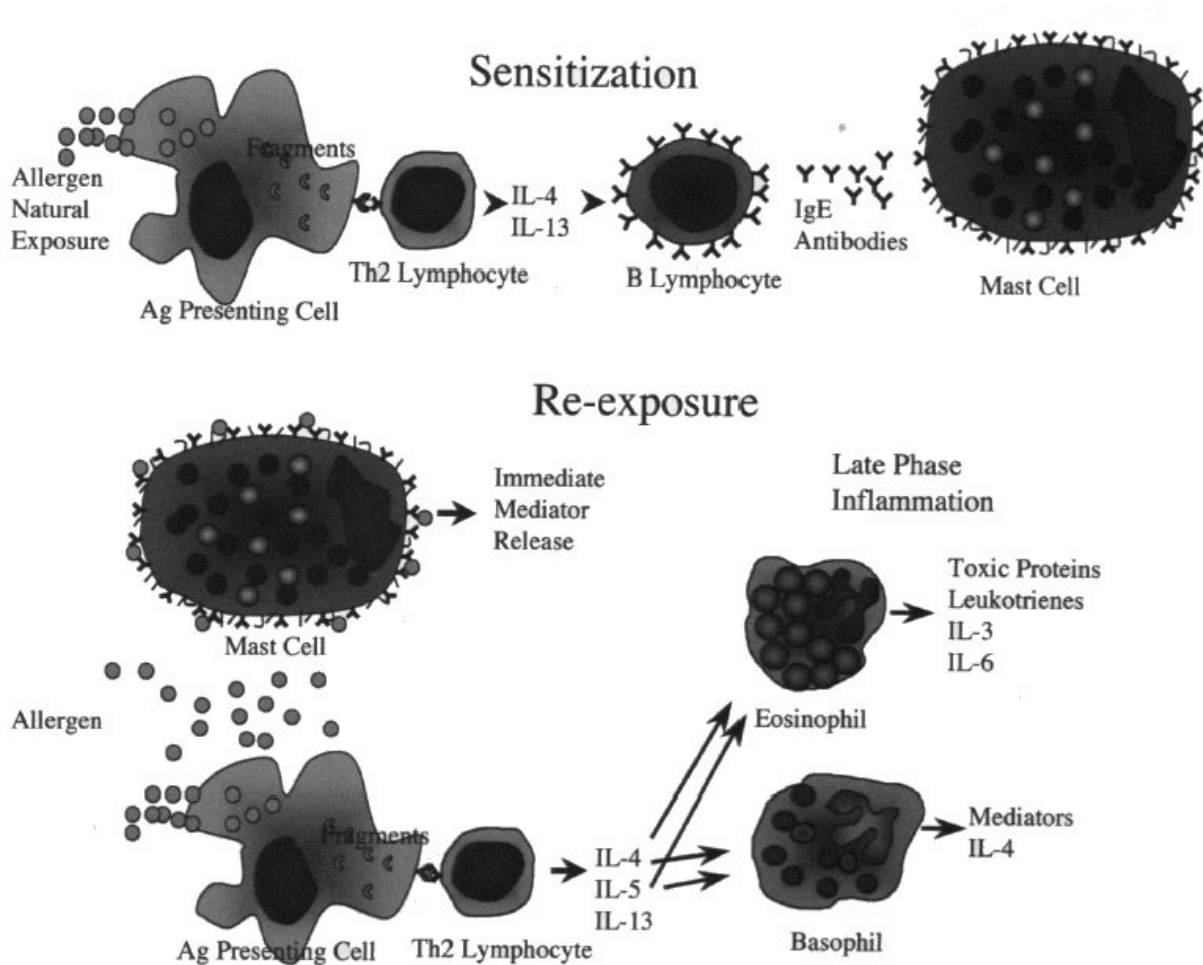


Abbildung 2 Konzept der Pathogenese einer allergischen Reaktion (aus Norman 2004)

2.4 Klinische Symptome einer Hymenopterenallergie

Die Symptome der allergischen Reaktion auf Hymenopterenstiche sind vielfältig. Neben starken lokalen Schwellungen an der Stichstelle treten besonders häufig allergische Soforttyp-Reaktionen auf, die durch giftspezifische IgE-Antikörper vermittelt werden und mit den Leitsymptomen Urtikaria, Angioödem, Asthma und anaphylaktischem Schock einhergehen.

Als schwere Lokalreaktion wird eine Schwellung um die Einstichstelle definiert, welche mehr als 10 cm im Durchmesser beträgt und länger als 24 Stunden persistiert. Gelegentlich kann die Schwellung eine ganze Extremität betreffen und über Wochen andauern (Przybilla et al. 2004, Bilo et al. 2005).

Es hat sich bewährt, den Schweregrad der systemischen Reaktionen zu bewerten. Hierzu sind unterschiedliche Skalensysteme im Gebrauch. Häufig angewandt wird die in Tabelle 2 dargestellte Einteilung nach H.L. Mueller.

Schwere Lokalreaktion	Schwellung an der Stichstelle mit Durchmesser > 10 cm, Dauer > 24 Stunden
Allgemeinreaktionen	
Grad I	generalisierte Urtikaria, Pruritus, Übelkeit, Angst
Grad II	beliebige Symptome von Grad I und 2 oder mehr der folgenden: Angioödem (allein schon Grad II), Engegefühl, Erbrechen Durchfall, Bauchkrämpfe, Schwindel
Grad III	beliebige Symptome von Grad I und II und 2 oder mehr der folgenden: Atemnot, Giemen, Stridor (jedes allein schon Grad III), Dysphagie, Dysarthrie, Heiserkeit, Schwäche, Benommenheit, Todesangst
Grad IV	beliebige Symptome von Grad I-III und 2 oder mehr der folgenden: Blutdruckabfall, Kollaps, Bewusstlosigkeit, Inkontinenz (Urin, Stuhl), Zyanose
Ungewöhnliche Reaktionen	
Serumkrankheitssyndrom	
generalisierte Vasculitis	Fieber, Gelenkschmerzen, Schwellungen, Lymphadenopathie, Exanthem, vaskulitische Purpura
Nierenaffektionen	Glomerulonephritis, nephrotisches Syndrom
Nervenaffektionen	periphere Neuritis, Polyradikulitis, epileptiforme Krämpfe, reversible und irreversible zentralnervöse Ausfallserscheinungen
Blutaffektionen	Thrombozytopenie, hämolytische Anämie, disseminierte intravaskuläre Gerinnung
Herzaffektionen	Angina pectoris, Myokardinfarkt, Herzrhythmusstörungen

Tabelle 2 Einteilung der allergischen Reaktionen auf Hymenopterenstiche (nach H.L. Mueller, ergänzt und leicht modifiziert)

Hautsymptome äussern sich am häufigsten als Urtikaria oder als Angioödem, gelegentlich auch als generalisiertes oder mehr auf den Kopf beschränktes Erythem mit Konjunktivitis. Weit seltener sind makulo-papulöse Exantheme (Müller 1989).

Bei der gastrointestinalen Symptomatik handelt es sich um Uebelkeit, Erbrechen, Abdominalkrämpfe und Diarrhoe. Frauen klagen hin und wieder über heftige Unterleibskrämpfe, die am ehesten durch Spasmen der Uterusmuskulatur bedingt sind.

Der respiratorischen Symptomatik liegt entweder eine Bronchialobstruktion im Sinne eines Asthma bronchiale oder ein Larynxödem mit in- und expiratorischem Stridor zugrunde. Als Warnsymptome für ein beginnendes Larynxödem gelten Kratzen im Hals, Heiserkeit, Schluckbeschwerden und eine kloßige Sprache. Selten kann im Rahmen von insektenstichallergischen Soforttyp-Reaktionen das Bild eines allergischen Lungenödems beobachtet werden (Müller 1989, Przybilla 1995).

Eine kardiovaskuläre Symptomatik tritt selten isoliert auf und reicht von leichtem Schwindelgefühl und Herzklopfen bis hin zum anaphylaktischen Schock, wobei das Vollbild eines solchen pathogenetisch multifaktoriell bedingt ist. Eine Flüssigkeitssequestration infolge Gefäßpermeabilitätssteigerung und Kapillardilatation sowie ein Flüssigkeitsverlust nach aussen durch Erbrechen und Durchfall führt zu einer Hypovolämie. Bronchospasmus, Schleimhautödem und Sekretionssteigerung im Bereich der Atemwege haben eine Bronchialobstruktion mit Hypoxie und Azidose zur Folge. Diese beeinträchtigen ihrerseits die Herzleistung, andererseits wirken die bei der allergischen Reaktion freigesetzten Mediatorsubstanzen direkt kardiotoxisch, was sich klinisch in Rhythmusstörungen, Blockbildern und gar als koronare Minderdurchblutung bis zum Vollbild des Myokardinfarktes äußern kann (Müller 1989).

Neben den oben erwähnten Soforttypreaktionen werden bei einem kleineren Teil der Patienten selten auch Krankheitsbilder mit längerer Reaktionszeit, längerer Dauer und untypischer Symptomatik beobachtet. Diese sind unter dem Begriff „ungewöhnliche Reaktionen“ zusammengefasst (vergleiche dazu Tabelle 2). Pathogenetisch werden hier vor allem Typ-III-Reaktionen diskutiert, obwohl der Nachweis von Immunkomplexen im Serum nur selten gelingt (Müller 1989, Przybilla et al. 2004, Bilo et al. 2005).

Neben den oben erwähnten allergischen Reaktionen nach Hymenopterenstich kann es unabhängig von der Stichzahl auch zu toxischen Reaktionen kommen. Die Giftmenge und Giftzusammensetzung ist hier im Gegensatz zu den allergischen Reaktionen entscheidend. Erwachsene können bis zu einige Hundert Bienenstiche und bis zu 40 Wespenstiche ohne letale Folgen ertragen, während es für den tödlichen Ausgang einer allergisch bedingten Reaktion bei einer sensibilisierten Person nur einen einzigen Stich braucht.

2.5 Diagnostik

Da mit der spezifischen Immuntherapie eine effiziente Behandlung zur Vermeidung IgE-vermittelter systemischer Reaktionen auf Bienen- und Wespengifte zur Verfügung steht, ist die Diagnostik von Insektenstichreaktionen besonders wichtig.

Ziel der Allergiediagnostik ist, das Vorhandensein einer IgE-vermittelten Typ-I-Reaktion nachzuweisen und das auslösende Insekt zu identifizieren. Grundlagen sind Anamnese, Hauttest (Pricktest und Intradermaltest) mit Hymenopterengiften sowie verschiedene in-vitro-Tests.

Zu den routinemäßigen Laboruntersuchungen gehört die Bestimmung der spezifischen Serum-IgE-Antikörper gegen Bienen-und Wespengift. Früher wurde dafür der RAST (Radio-Allergo-Sorbent-Test) eingesetzt, heute gibt es modernere Verfahren, welche anstelle von Radioisotopen Enzyme oder Fluoreszenzfarbstoffe als Marker der anti-IgE-Antikörper verwenden. Zu diesen Verfahren gehört u.a. der Immuno-CAP.

Die spezifischen IgE's sollten optimal frühestens 4 Wochen, wenn möglich jedoch im 1. Jahr nach der Stichreaktion bestimmt werden, da die Titer in diesem Zeitraum am höchsten sind (Reimers und Müller 2002, Przybilla et al. 2004).

Der Nachweis von sIgE sollte als prognostischer Wert für systemische Reaktionen dienen, jedoch nicht überbewertet werden. Bei 26% von Erwachsenen kann im Serum oder der Haut sIgE nachgewiesen werden und lediglich 3,3% haben eine allergische Reaktion. Möglich ist eine Sensibilisierung, welche jedoch asymptomatisch verläuft. Diese ist mit einer Inzidenz von 17% assoziiert, nach einem erneuten Insektenstich eine systemische Reaktion zu erleiden. Somit stellt zwar die bloße Anwesenheit von sIgE ein Risiko für spätere systemische Reaktionen dar, aber bisher gibt es keinen Parameter, welcher vorhersagen kann, welcher sensibilisierte Patient nun schlussendlich eine systemische Reaktion haben wird und welcher nicht (Golden 2005).

Bei negativen Hauttestergebnissen und fehlendem Nachweis spezifischer IgE werden weiterführende in vitro Tests empfohlen, wenn die Anamnese Anlass zur Annahme einer anaphylaktischen Reaktion gibt. Zu diesen aufwendigeren Laboruntersuchungen gehören zum einen die Mediatorfreisetzungsteste, zum anderen der Basophilenaktivierungstest. Mittels der Mediatorfreisetzungsteste wird die Freisetzung von Mediatoren wie Histamin (Histaminfreisetzungstest) oder Leukotrien (CAST = cellular antigen stimulation test) aus mit Allergen stimulierten Leukozyten des Patienten gemessen. Bei dem Basophilenaktivierungstest handelt es sich ebenfalls um einen zellulären Allergen-Stimulationstest. Hierbei werden ebenfalls zuerst Leukozyten mit Allergen stimuliert und anschliessend mit Anti-IgE- und Anti-CD 63-Antikörpern inkubiert. Danach wird die Menge der CD 63-positiven Basophilen flow-zytometrisch analysiert (Reimers und Müller 2002 und Bilò et al. 2005).

Da diese Tests in der Durchführung aufwendig und mit hohen Kosten verbunden sind, werden sie nicht routinemäßig und nur in spezialisierten Laboren durchgeführt (Renz et al. 2002). Außerdem existieren nur wenig Daten über die Sensitivität und Spezifität dieser Tests.

Bei Nachweis von spezifischen Serum-IgE gegen beide Gifte (Bienen- und Wespengift) ist ein Inhibitionstest („RAST-Inhibition“, „Immunoblot-Inhibition“) hilfreich, um zu unterscheiden, ob eine Kreuzreaktivität oder eine Mehrfachsensibilisierung vorliegt.

Bei jedem Patienten mit systemischer Soforttypreaktion – insbesondere mit respiratorischer oder kardiovaskulärer Symptomatik – auf Insektenstich wird die Bestimmung der basalen Serumtryptase-Konzentration empfohlen (Przybilla et al. 2004, Bilò et al. 2005). Ludolph-Hauser et al. fanden bei fast 30% der Insektengiftallergiker mit schweren Schockreaktionen erhöhte basale Tryptasewerte und bei etlichen dieser Patienten konnte eine kutane oder systemische Mastozytose nachgewiesen werden (Ludolph-Hauser et al. 1999). Ein hoher basaler Serumtryptasewert als Ausdruck einer erhöhten Gesamtkörper-Mastzellmasse ist daher ein Risikofaktor für schwere bedrohliche anaphylaktische Insektenstichreaktionen und erfordert eine langdauernde, eventuell lebenslängliche Immuntherapie (Reimer und Müller 2002).

Als weiterer in-vitro-Test hat sich der Immunoblot etabliert, vor allem bei fraglichen Befunden anderer in-vitro-Untersuchungsmethoden.

2.5.1 Immunoblot

Der Western Blot (syn: Immunoblot) bezeichnet den Transfer (Blotten) von Proteinen auf eine Trägermembran, welche anschliessend über unterschiedliche Reaktionen nachgewiesen werden.

Die Bezeichnung des Blot-Verfahrens kommt vom Englischen „blot“ = „Klecks, Fleck“ und dem „blotting paper“ = „Löschpapier“, bei dem ein identischer Abdruck des Originals entsteht. Der Name Western Blot geht auf den Namen des Erfinders der Blotting Technik namens Edwin Southern zurück, der 1975 die Methode für die Auftrennung von DNA-Fragmenten und nachfolgender Hybridisierung als Southern Blot eingeführt hat. In Anlehnung an seinen Namen wurde die entsprechende Auftrennung von RNA-Fragmenten Northern Blot und das Proteinblotting als Western Blot bezeichnet. Der Begriff Eastern Blot für den Transfer nativer Proteine aus nicht denaturierenden Gelen, in denen Proteine durch isoelektrische Fokussierung aufgetrennt wurden, hat sich nicht durchgesetzt.

Towbin et al. (Towbin et al. 1979) beschrieben 1979 erstmalig den Transfer von Proteinen von einem Polyacrylamidgel auf eine Nitrozellulosemembran im elektrischen Feld. Der eigentliche Name Western Blot wurde von W.N.Burnette im Jahre 1981 eingeführt, als eine Allusion zum Southern und Northern Blot sowie zur geographischen Lage seines Labors (er arbeitete zu dieser Zeit in Seattle) (Burnette und Towbin 1979, Burnette 1981).

Vor dem eigentlichen Western Blot wird ein Proteingemisch mit Hilfe einer Gel-Elektrophoresetechnik in einer Trägermatrix (SDS-PAGE, native PAGE, isoelektrische Fokussierung, 2D-Gelelektrophorese) entsprechend ihrer Größe, Ladung oder anderer Eigenschaften aufgetrennt. Hierbei werden die zu untersuchenden Proteine zuerst mit einem Gel (in der Regel ein Polyacrylamid-Gel) in einzelne Proteinbanden aufgetrennt. Anschließend werden die Proteine beim Blotting vom Polyacrylamid-Gel durch ein senkrecht zum Gel angelegtes elektrisches Feld eluiert und auf eine Membran (Nitrozellulose, Nylon oder Polyvinylidendifluorid (PVDF)) transferiert. An der Membranoberfläche bleiben diese aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten. Bei diesem Vorgang wird das an den Proteinen angelagerte SDS ausgewaschen. Daher können die Proteine renaturieren und teilweise ihre Sekundär- und Tertiärstruktur wieder einnehmen.

Die Proteinbanden können nun auf der Membran mit Hilfe von spezifischen Antikörpern identifiziert werden. Spezifische Antikörper binden an der passenden Proteinbande auf der Membran. Unspezifisch gebundene Antikörper werden aufgrund von Waschschritten mit den Puffern, welche Detergenzien enthalten, wieder entfernt.

Die Proteine können aber auch über alternative Methoden detektiert werden. Über bestimmte Farbstoffe wie Coomassie, Ponceau, kolloidales Gold, Amidoschwarz oder Tusche werden alle Proteine unspezifisch markiert. Andere Farbstoffe sind in der Lage, alle phosphorylierten Proteine zu markieren. Je nach Versuchsaufbau können einzelne Proteine auch direkt visualisiert werden, z.B. radioaktiv markierte Proteine oder bei Enzymen durch Umsetzen des entsprechenden Substrates.

2.5.2 Zukunftsperspektiven

Die diagnostischen Tests – Hauttest und RAST - der Insektengiftallergie gelten als zuverlässig. Bei genauerer Betrachtung ist die Spezifität dieser Tests jedoch suboptimal. Ca. 20% der Individuen, welche nie eine allergische Allgemeinreaktion durchgemacht haben, reagieren positiv. Andererseits reagieren lediglich 30-50% der Patienten mit anamnestischer Insektenstichallergie und positiven Tests beim nächsten Stich mit erneuten Allgemeinreaktionen. Es besteht daher ein erhebliches Verbesserungspotential für die Diagnostik der Hymenopterenallergie (Müller 2002).

Dank moderner molekularbiologischer Technologien stehen heute eine Reihe von Insektengiften in rekombinanter Form zur Verfügung und eröffnen eine Reihe von Möglichkeiten zur Verbesserung in der Diagnostik der Hymenoptereingiftallergie. In einer Anzahl experimenteller Studien wurden bisher einige dieser Möglichkeiten analysiert. In absehbarer Zukunft werden rekombinante Cocktails in der Diagnostik eingesetzt. Dies

könnte zu einem signifikanten Anstieg der Spezifität der routinemäßig verwendeten diagnostischen Tests, der Hauttests auf Soforttypreaktionen und der Bestimmung spezifischer Serum-IgE-Antikörper führen (Müller 2002).

2.6 Therapie der Hymenopterenallergie

2.6.1 Allgemeine Maßnahmen

Dazu gehört die eingehende Information des Patienten über Maßnahmen zur Vermeidung erneuter Stiche sowie über das Verhalten bei einem weiteren Stich. Insektengiftallergikern wird zudem das ständige Mitführen eines Notfallsets empfohlen. Dieses besteht aus einem H1-Rezeptor-blockierendem Antihistaminikum mit raschem Wirkungseintritt und einem systemischen Glukokortikoid. Patienten mit anamnestisch schweren systemischen Reaktionen, insbesondere mit respiratorischer und/oder kardiovaskulärer Symptomatik, sollten zusätzlich auch Adrenalin als Notfallmedikament erhalten, entweder in Form eines Dosieraerosols oder in Form einer Selbstinjektionsspritze. (Müller 1989, Przybilla et al. 2004, Bonifazi et al. 2005).

2.6.2 Die spezifische Immuntherapie

Die spezifische Immuntherapie (SIT, syn. Desensibilisierung, Hyposensibilisierung) ist, neben o.g. Maßnahmen ein weiterer Baustein der Therapie allergischer Erkrankungen geworden. Da sie in die grundlegenden immunologischen Mechanismen allergischer Krankheitsbilder eingreift, ist sie bisher die einzige kausale Therapie IgE-vermittelter allergischer Erkrankungen.

Der erste Bericht einer erfolgreichen SIT wurde im Jahre 1911, also vor fast 100 Jahren, von Leonard Noon publiziert. Er konnte zeigen, dass eine „prophylaktische Inokulation“, d.h. eine titrierte, subkutane Injektion von Pollenextrakt zur Linderung von Heuschnupfensymptomen führte (Noon 1911). Dieses Konzept wurde bald auch für Insektengiftallergiker übernommen. Über mehrere Jahre wurden die Patienten jedoch mit Ganzkörperextrakten behandelt, was nur zu begrenztem Erfolg führte. 1978 konnten Hunt et al. nachweisen, dass Ganzkörperextrakte zur Behandlung von Hymenoptereingiftallergikern nicht wirksamer waren als Placebo. In der gleichen Studie wurde erstmals auch der Einsatz von reinem Bienen- und Wespengift untersucht. Insektengiftallergiker wurden mit Placebo, Ganzkörperextrakt oder reinem Insektengift hyposensibilisiert. Nach 6 bis 10 Wochen Therapie erfolgte eine Stichprovokation. Es konnte gezeigt werden, dass eine Therapie mit reinem Insektengift signifikant besser vor systemischen anaphylaktischen Reaktionen schützt als Placebo oder

Ganzkörperextrakte (Hunt et al. 1978). In den folgenden Jahren konnte durch weitere zahlreiche kontrollierte Studien der Erfolg einer spezifischen Immuntherapie bei Insektengiftallergikern belegt werden (Ross et al. 2000).

In mehreren Studien mit Stichprovokationstesten fand sich ein vollständiger Schutz nach einer SIT bei erneutem Stich durch das entsprechende Insekt von etwa 95% für Wespengiftallergiker und 80-90% für Bienengiftallergiker (Ruëff et al. 1996).

Die immunologischen Wirkmechanismen sind allerdings noch immer nicht in allen Einzelheiten bekannt, sind aber fortlaufend Gegenstand von Untersuchungen.

Ein erster auftretender Effekt nach den ersten Injektionen einer SIT ist die Desensibilisierung der Basophilen und Mastzellen, d.h. die Degranulationsaktivität und damit das Auftreten von systemischen Reaktionen nimmt ab (Akdis und Akdis 2007).

Mittelfristige Effekte einer SIT bestehen in einer Wirkung auf die T-Zellen, indem eine periphere T-Zell-Toleranz induziert wird. Diese ist vor allem charakterisiert durch die Bildung von allergenspezifischen T-regulatorischen Zellen (Tregs). Dabei wurden eine Anzahl verschiedener Subtypen von Tregs beschrieben. Zum einen gibt es die natürlich vorkommenden, vom Thymus selektierten CD4+CD25+ Tregs. Zum anderen konnten in *in vitro* und *in vivo* Studien eine grosse Anzahl von T-Zell-Populationen induziert werden, welche als adaptative Tregs bezeichnet wurden. Dazu gehören die induzierten CD4+CD25+ Tregs, Typ 1 Treg-Zellen (Tr1), IL-10 produzierende Tregs und Th3-Zellen (Robinson et al. 2004). Durch die SIT kommt es nun zu einer vermehrten Ausschüttung der Zytokine TGF- β (Wachstumsfaktor) und IL-10 aus den Treg-Zellen. Dadurch wird die Funktion der Th2-Zellen gehemmt, im Sinne einer Induktion von Anergie, einer verminderten Reaktionsbereitschaft mit abnehmender Zytokinproduktion und Proliferation nach Stimulation über den T-Zell-Rezeptor (Immunmodulation) (Klein-Tebbe et al. 2006, Akdis und Akdis 2007, Bohle 2008).

Längerfristig kommt es durch die SIT zu einer Verschiebung des Verhältnisses Th1 und Th2 zugunsten der Th1-Antwort (Immundeavation): IL-12 aus antigenpräsentierenden Zellen (APZ) stimuliert die Interferon-(INF-) γ -Produktion der Th1-Zellen. INF- γ wiederum hemmt zum einen die Differenzierung der Th2-Zellen; somit stehen weniger Th2-Zellen zur Verfügung, um die Produktion von IgE-Antikörpern durch B-Zellen zu stimulieren. Zum anderen wird die IgE-Bildung durch INF- γ direkt gehemmt (Klein-Tebbe et al. 2006). Andererseits wird durch die SIT, wie bereits oben beschrieben, die IL-10-Produktion und Sekretion aus Tregs gesteigert. IL-10 ist nicht nur verantwortlich für die periphere T-Zell-Toleranz, sondern reguliert auch den Isotypenklassenwechsel, vom IgE-dominierten zum IgG4-dominierten Phänotyp (Akdis und Akdis 2007). Somit kommt es also sekundär zu einer Veränderung der Immunglobulinproduktion der B-Lymphozyten mit Induktion der allergenspezifischen IgG- insbesondere IgG4-Produktion und gegebenenfalls langsamer

Reduktion der allergenspezifischen IgE-Produktion. Neuere Studien lassen darauf schließen, dass eine erfolgreiche SIT aber nicht nur von der Quantität der „blockierenden“ IgG abhängig ist, sondern auch von funktionellen Änderungen des Immunglobulins G (Wachholz und Durham 2004).

Weitere Langzeiteffekte einer SIT betreffen auch die Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen. Es konnte gezeigt werden, dass IL-10 die proinflammatorischen Zytokine, welche von Mastzellen ausgeschüttet werden, reduziert. Weiterhin wird durch IL-10 die Eosinophilenfunktion und –aktivität herunterreguliert und die Produktion von IL-5 - als wichtigster Basophilen- und Eosinophilenaktivator - von Th2-Zellen unterdrückt. Es resultiert insgesamt eine Reduktion der Mastzell- und Eosinophileninfiltration im Gewebe (Norman 2004, Akdis und Akdis 2007). Vergleiche dazu auch Abbildung 3.

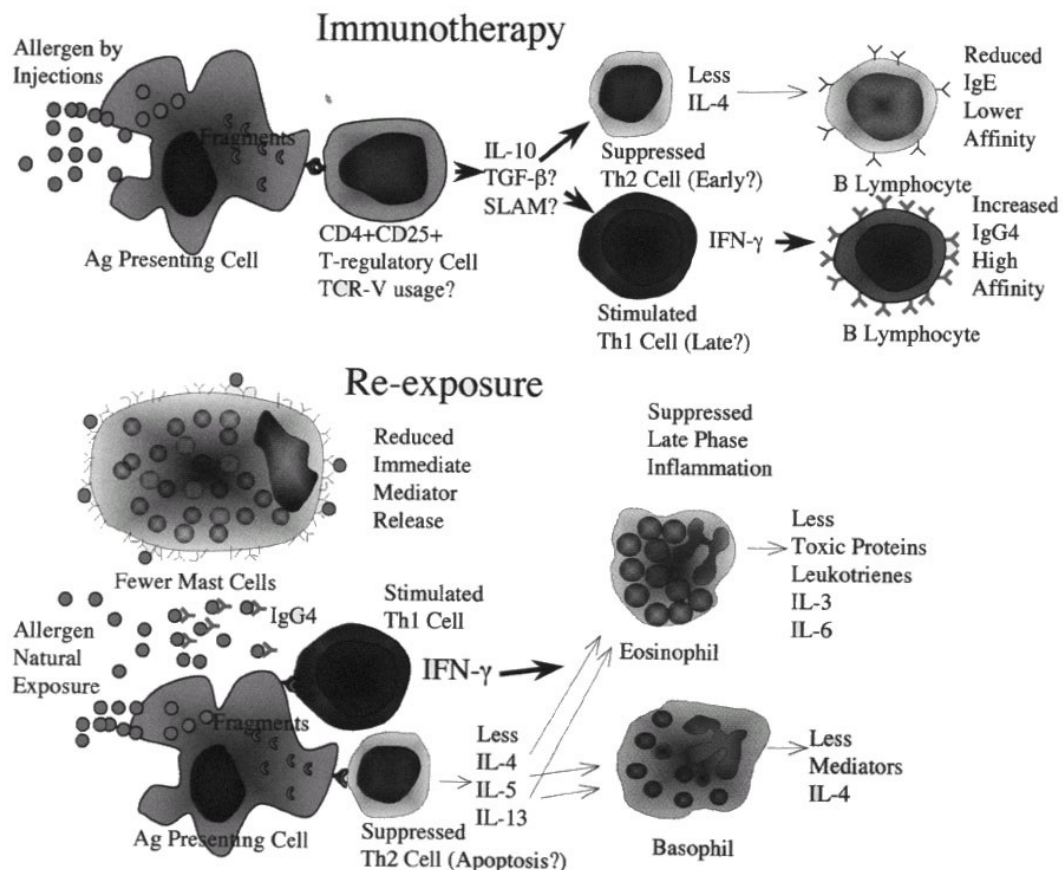


Abbildung 3 Modell der immunologischen Effekte unter der spezifischen Immuntherapie (aus Norman 2004)

2.6.3 Zukunftsperspektiven

Eines der Hauptprobleme bei der klassischen Hyposensibilisierung besteht in dem Auftreten von Nebenwirkungen, welche meist als Soforttypreaktionen charakterisiert sind und sich

entweder lokal oder seltener generalisiert manifestieren. Unerwünschte Reaktionen treten bei ca. 40% der Patienten unter SIT mit Bienengift und bei ca. 5-10% der Patienten unter SIT mit Wespengift auf (Müller 2003).

Von allgemeinem Interesse sind deshalb neue Methoden, welche die Nebenwirkungen, insbesondere die Soforttypreaktionen, einer SIT reduzieren sowie die Effektivität der SIT steigern. Diesbezüglich gibt es einige vielversprechende neue Möglichkeiten, die meisten auf der Basis gentechnologischer Methoden. Dazu gehören modifizierte rekombinante Allergene, Immuntherapie mit T-Zell Epitop Peptiden sowie Impfungen mit DNA (Müller 2003, Nelson 2007).

Ob diese neuen Ansätze die aktuelle SIT ersetzen werden, bleibt abzuwarten. Es bedarf noch experimenteller sowie vorklinischer Arbeiten, um zu zeigen, dass diese neuen Methoden im Vergleich zur aktuellen SIT sicherer, komfortabler sowie kosteneffizient sind, bei zumindest gleichbleibender oder verbesserter Wirksamkeit.

3 Ziele der Arbeit

In zahlreichen Studien wurde die Nützlichkeit einer spezifischen Immuntherapie bei Insektenstichallergikern bewiesen. Zwischen 80 und 95% der Patienten sind nach einem erneuten Stich vor einer systemischen Reaktion geschützt, wobei Wespengiftallergiker nach einer SIT mit Wespengiftpräparaten besser geschützt scheinen (>90%) als Bienengiftallergiker nach einer SIT mit Bienengiftpräparaten (80-90%) (Müller 2003).

Um die Wirksamkeit der SIT bei Insektengiftallergikern zu ermitteln, stehen bis heute keine sicheren diagnostischen Parameter zur Verfügung. Lediglich ein Feldstich oder eine Stichprovokation unter stationären Bedingungen gibt Aufschluss über den momentanen Schutz eines Patienten vor einer systemischen Reaktion nach erneutem Insektenstich. Dabei ergeben sich jedoch verschiedene Probleme, so ist bei einem Feldstich die sichere Identifikation des stechenden Insektes eine mögliche Fehlerquelle. Hinzu kommt die subjektive Interpretation einer allergischen Reaktion, welche bei einer Stichprovokation unter Krankenhausbedingungen besser objektiviert werden kann. Problematisch bei einer Stichprovokation, insbesondere bei Wespenstichen, ist die stark schwankende Giftmenge pro Stich. Zudem ist eine Stichprovokation unter stationären Bedingungen mit einem erhöhten Aufwand verbunden; sie muss unter konsequenter Monitorisierung und ärztlicher Aufsicht erfolgen. Das Vorhandensein einer suffizienten Notfallausrüstung inklusive Intubationsbesteck ist erforderlich. Deshalb ist sie nur an wenigen Zentren verfügbar und kann damit nur einer begrenzten Anzahl Patienten angeboten werden.

Von den Laborparametern, welche sich während einer SIT mit Bienen- oder Wespengift ändern, haben hinsichtlich prognostischer Bedeutung vor allem das spezifische IgG und insbesondere das spezifische IgG4 viel Beachtung erfahren.

Der Immunoblot, welcher bei unseren Untersuchungen eingesetzt wurde, unterscheidet sich von der klassischen sIgE- oder sIgG/IgG4-Nachweismethode dadurch, dass mit dem Immunoblot nicht nur die Gesamtreaktivität, sondern spezifische Antikörperreaktivitäten gegen jedes einzelne Allergen im Gesamtallergenextrakt erfasst werden können.

Möglicherweise erweist sich der Immunoblot als geeigneter therapiebegleitender Labortest einer SIT, wie dies bereits von einigen Autoren gezeigt werden konnte (Jeep et al. 1996, Ollert und Ring 1999, Freising und Jappe 2006).

Ziel dieser Arbeit ist daher, zu untersuchen, ob anhand des Verlaufes der spezifischen Immunglobuline (sIgE und sIgG4) gegen die Einzel-Allergene des Insektengiftes, Aussagen über die Wirksamkeit der SIT bzw. das Outcome eines Feldstiches getroffen werden können.

4 Methodik

4.1 Patientenkollektiv

Die Seren für die Untersuchungen stammen von Patienten, welche aufgrund einer Bienen- und/oder Wespengiftallergie mit einer spezifischen Immuntherapie auf der Allergiestation des Universitätsspitals Zürich behandelt wurden.

Bei allen Patienten wurde retrospektiv nach einem Stichereignis in der Krankengeschichte und mittels Telefoninterview geforscht.

Insgesamt wurden die Seren von 41 Patienten, 18 Frauen und 23 Männer untersucht. Davon sind 15 Patienten Bienengiftallergiker, 24 Patienten Wespengiftallergiker und 2 Patienten allergisch auf Bienen- und Wespengift.

13 der Bienengiftallergiker wurden mit Bienengift allein, 2 mit Bienen- und Wespengift hyposensibilisiert. Von den Wespengiftallergikern wurden 22 mit Wespengift allein und 2 mit Bienen- und Wespengift hyposensibilisiert. 2 Patienten, welche auf Bienen- und Wespengift allergisch reagierten, wurden mit Bienen- und Wespengift hyposensibilisiert. Siehe dazu auch Abbildung 4.

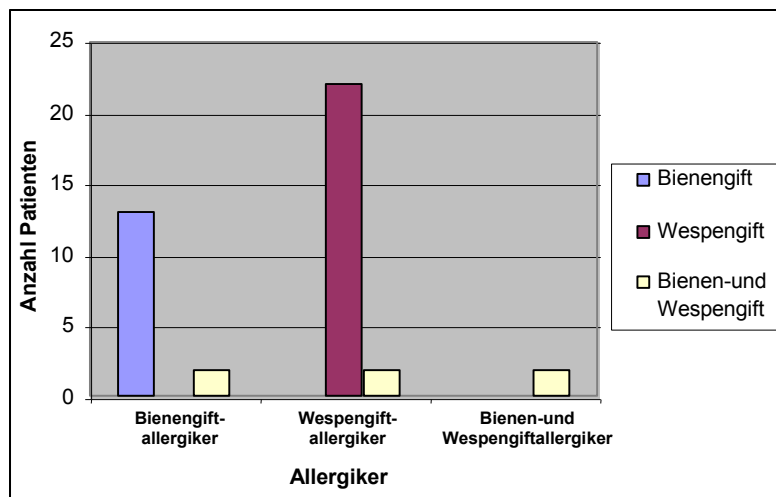


Abbildung 4 Hyposensibilisierung

Die Alterspanne zu Beginn der Hyposensibilisierungstherapie lag zwischen 18 und 64 Jahren, dies entspricht einem Mittelwert von 36 Jahren.

4.2 Material und Methoden

4.2.1 Hyposensibilisierungstherapie

Die spezifische Immuntherapie wurde als Schnellhyposensibilisierung begonnen. Für die Einleitungsphase wurden die Patienten stationär aufgenommen. Die Injektionen wurden nach dem Schema, welches in Tabelle 3 dargestellt ist, verabreicht. Die Fortsetzungsbehandlung erfolgte ambulant mit Repetition der Erhaltungsdosis nach 2 Wochen, nach 3 Wochen und dann in monatlichen Abständen bis zum Abschluss der Behandlung.

Die Hyposensibilisierungen erfolgten mittels kommerzieller Hyposensibilisierungslösungen; entweder mit Pharmalgen[®], einem reinen, lyophilisierten Giftpräparat oder mit ALK Alutard SQ[®], ein an Aluminiumhydroxid adsorbierter, selektiv gereinigter Allergenextrakt mit Depotwirkung.

Tag	Konzentration (µg/ml)	Volumen (ml)	Dosis (µg)
1	0.1	0.1	0.01
	1	0.1	0.1
		0.2	0.2
		0.5	0.5
2	10	0.1	1
		0.2	2
		0.4	4
		0.7	7
3	100	0.1	10
		0.2	20
		0.4	40
4	100	0.6	60
		0.8	80
5	100	1	100

Tabelle 3 Therapieprotokoll der Einleitungsphase

4.2.2 IgE- und IgG4-Bestimmung

Serumproben für die Immunoblotuntersuchung wurden den Patienten vor Beginn der Therapie, nach 3 Monaten und nach 3 Jahren Therapie entnommen.

Die Immunoblotuntersuchungen für bienen- und wespengiftspezifisches IgE und IgG4 wurden mit den Blotstreifen AlaBLOT[®] und den dazugehörigen Reagenzien der Firma DPC

Biermann (Diagnostic Products Corporation-Biermann, Bad Nauheim, Germany) durchgeführt.

Der AlaBLOT® spezifischer IgE- und IgG-Test dient dem Nachweis von IgE- und IgG-Antikörper gegen antigene Komponenten spezifischer Antigene – in unserem Fall gegen Bienen- und Wespengifte - in humanem Serum.

4.2.2.1 Testprinzip

Im Immunoblot werden die Insektengifteproteine zunächst in einer SDS-Page-Elektrophorese (sodium dodecyl-sulfate-polyacrylamid-gel-elektrophorese) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Proteine und Glycoproteine werden dazu in einer SDS-haltigen, alkalischen Lösung denaturiert, so dass oligomere Proteine in ihre Untereinheiten zerfallen und die Polypeptidketten sich entfalten. Die denaturierten Polypeptide werden von dem SDS umschlossen und bilden elektronegative Komplexe gleicher Beladung. Die so vorbehandelten Proteine werden nun elektrophoretisch im Polyacrylamidgel aufgetrennt, wobei die Wanderung des elektronegativ geladenen SDS-Polypeptid-Komplexes zur Anode hauptsächlich von der Größe des Komplexes abhängig ist (große Proteinmoleküle wandern langsamer als kleinere).

Anschließend wird eine Nitrozellulosemembran in direkten Kontakt mit dem Polyacrylamidgel gebracht und die im Gel befindlichen Proteine per Elektrotransfer auf die Nitrozellulosemembran übertragen. Dort binden sie sich und geben ein exaktes Abbild des Gels wieder. Die Nitrozellulosemembran wird folgend mit dem Patientenserum inkubiert. Bei Vorhandensein von Antikörpern gegen verschiedene Bestandteile des Insektengiftes binden sich diese an die Membran. Sie können anschließend mit enzymgekoppelten Antikörpern sichtbar gemacht werden. Der AlaBLOT® nutzt hierbei als Enzym alkalische Phosphatase. Damit erlaubt die Farbreaktion den Nachweis der entsprechenden Antikörperbindung an einzelne Allergene im aufgetrennten Gift.

4.2.2.2 Testdurchführung

Vor Testbeginn werden 50 µL Patientenserum 1:10 mit AlaBLOT® Probendiluent, spezifisches IgE bzw. 1:100 mit AlaBLOT® Probendiluent, spezifisches IgG4 auf ein Gesamtvolumen von 500 µL verdünnt.

Anschließend erfolgt die Rehydrierung der Immunoblotstreifen, wobei diese mit 1mL Waschlösung überschichtet werden und für 5-10 Minuten auf einem Schüttler belassen werden. Dann wird die Waschlösung sorgfältig abgesaugt. Danach werden 500 µL des 1:10 (spezifisches IgE) bzw. 1:100 (spezifisches IgG4) vorverdünnten Patientensersums in die entsprechenden Reservoirs auf die Blotstreifen pipettiert. Diese werden nun bei

Raumtemperatur auf einem Schüttler für 2 Stunden inkubiert. Nach Absaugen der verdünnten Patientenprobe werden die Blotstreifen 3x für 5-10 Minuten mit 1 mL Waschlösung unter schütteln gewaschen. Nach vollständigem Absaugen der Waschlösung wird jetzt 0.5 mL der AlaBLOT® Anti-IgE- bzw. Anti-IgG4/-Enzymkonjugatlösung in jedes Reservoir pipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. Anschließend folgen erneut 3 Waschdurchgänge, bei denen jeder Blotstreifen jeweils mit 1mL Waschlösung für 5-10 Minuten unter Schütteln inkubiert wird. Es erfolgt nun die Zugabe von 0.5 mL AlaBLOT® Substratlösung. Diese sollte bis zum Erzielen eines deutlichen Bandenmusters für 15 Minuten oder länger auf den Blotstreifen belassen werden. Als letzter Schritt wird nun zum Abstoppen der Farbentwicklung jeder Blotstreifen 3x für 5 Minuten mit je 1 mL destilliertem Wasser unter schütteln gewaschen. Die Streifen können nun auf einem Filterpapier an der Luft getrocknet werden.

4.2.2.3 Auswertung der Immunoblots

Die semiquantitative Auswertung der Immunoblots erfolgte mit der Software QuantiScan (Biososoft, Cambridge, UK).

Das Computerprogramm dient der automatischen Erkennung und Flächenbestimmung der zweidimensionalen Banden im zuvor digitalisierten Immunoblot. Die Flächenwerte der einzelnen Immunglobulin-Fractionen entsprechen der Menge der in den einzelnen Fraktionen enthaltenen Teilchen. Dadurch wird eine relative Quantifizierung der Immunglobulinkonzentration der Patientenserum ermöglicht. Eine entsprechende Darstellung der densitometrischen Auswertung der Blotstreifen mit den entsprechenden AlaBLOT-Streifen siehe Abbildung 5.

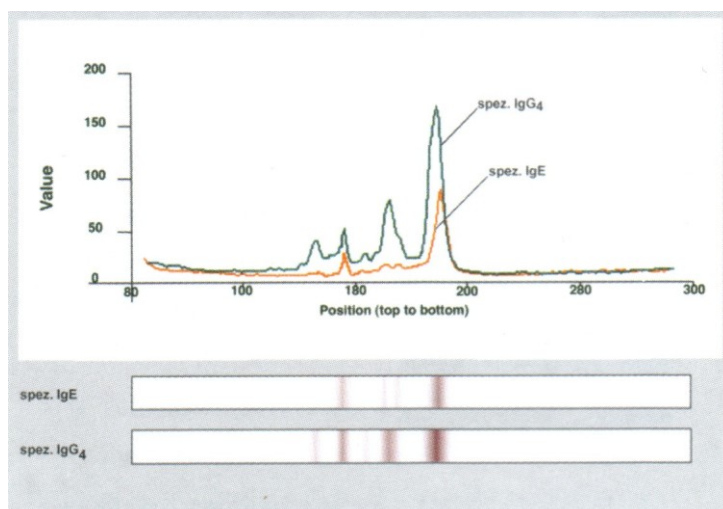


Abbildung 5 Scannerauswertung spezifisches IgE/spezifisches IgG4

4.2.3 Statistische Auswertung

Die ursprünglichen Werte der slgE - und slgG4 -Titer (gemessen als Flächeninhalte unter der Kurve (NetAreas)) in Abhängigkeit der Zeit deuten auf einen exponentiell steigenden oder fallenden Verlauf. Nach einer logarithmischen Transformation der Messungen erscheinen die Verläufe in Streifen fast konstanter Breite. Eine positiv linear ansteigende Verlaufskurve entspricht einer konstant relativen Zunahme, eine linear abfallende Verlaufskurve entspricht einer konstant relativen Abnahme.

Ob eine Kurvenschar signifikant zu- oder abnimmt, kann durch den Vergleich der Differenzen zwischen zwei Zeitpunkten und dem hypothetischen Wert Null geprüft werden. So lassen sich die Verlaufskurven mit dem klassischen t-Test für eine Stichprobe, aber auch für zwei unabhängige Stichproben, auf Zu- oder Abnahme prüfen. Wenn der P-Wert des Testes 5% nicht übersteigt, spricht man von einem signifikanten Unterschied. Entsprechend können für die geschätzten relativen Zu- respektive Abnahmen 95% Konfidenzintervalle angegeben werden. Enthält ein Konfidenzintervall den Wert Null nicht, so ist dies äquivalent einer signifikanten Zu- respektive Abnahme bei Vorgabe einer Konfidenzwahrscheinlichkeit von 5%.

5 Ergebnisse

5.1 Das Verhalten des sIgE vor und während der spezifischen Immuntherapie

Von jedem Patienten wurde der Flächeninhalt unter der Kurve für sIgE zu den verschiedenen Zeitpunkten abgebildet. Dies erfolgte getrennt für Bienen- und Wespengiftallergiker sowie für jede einzelne Bande. Patienten mit einer Bienen- und Wespengiftallergie wurden für die jeweiligen Banden entweder den Bienen- oder den Wespengiftallergikern zugeordnet. Die entsprechenden Werte für die Bienen- oder Wespengiftallergiker siehe Tabelle 4, für die Wespengiftallergiker siehe Tabelle 5. In den jeweiligen Tabellen ist die Allergie des Patienten (Bienen- oder Wespengiftallergie (B), Wespengiftallergie (W), Bienen- und Wespengiftallergie (BW)), die erfolgte Hyposensibilisierungsbehandlung (SIT mit Bienen- oder Wespengift (B), mit Wespengift (W), mit Bienen- und Wespengift (BW)) sowie die logarithmierten NetArea-Werte für sIgE für die jeweiligen Banden zu den entsprechenden Zeitpunkten angegeben.

5.1.1 Bienen- oder Wespengiftallergiker – Bande 18 kDa (Phospholipase A2)

Nach 3 Monaten ist die Abnahme der NetArea-Werte des sIgE nicht signifikant (Konfidenzintervall 0.13 - -0.12; $p=0.96$), wird es aber zwischen dem 3. Monat und dem 3. Jahr (Konfidenzintervall -0.29 - -0.54; $p<0.001$).

Bei 13 von insgesamt 17 Patienten kam es im Verlauf von 3 Jahren zu einer Abnahme der NetArea-Werte, bei 2 Patienten waren nach 3 Jahren keine Banden gegen die Phospholipase A2 mehr nachweisbar. Bei 2 Patienten nahmen die NetArea-Werte zu. Insgesamt ist die Abnahme nach 3 Jahren gegenüber dem Ausgangswert signifikant (Konfidenzintervall -0.19 - -0.61; $p=0.001$). Siehe Abbildung 6.

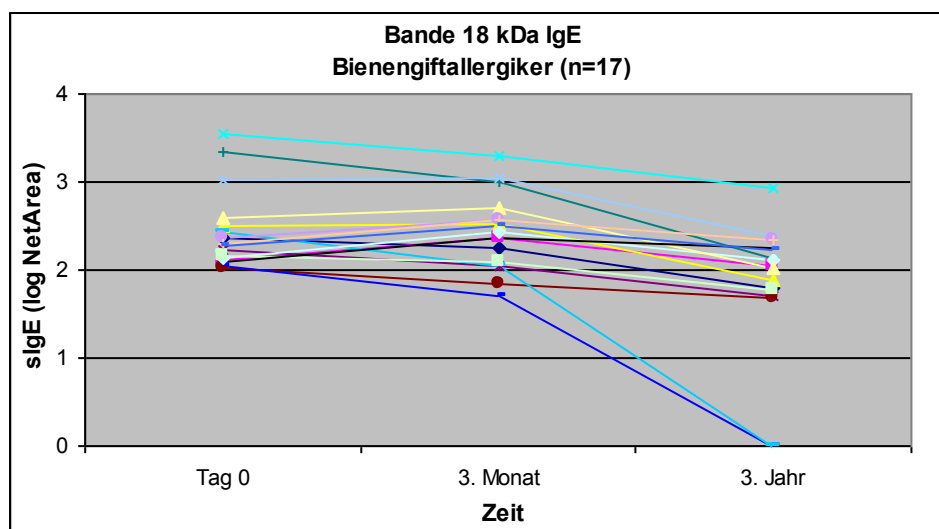


Abbildung 6 Verlauf des sIgE unter SIT aller Bienen- oder Wespengiftallergiker für die Bande 18 kDa

5.1.2 Bienengiftallergiker - Bande 44 kDa (Hyaluronidase)

Ebenso wie die Verläufe der NetArea-Werte des sIgE gegen Phospholipase A2 (Bande 18 kDa) verhielten sich die Verläufe der Werte des sIgE gegen Hyaluronidase (Bande 44 kDa). Keine signifikante Abnahme nach 3 Monaten (Konfidenzintervall 0.16 - -0.11; $p=0.72$), dafür eine signifikante Abnahme zwischen dem 3. Monat und 3. Jahr (Konfidenzintervall -0.11 - -0.57; $p=0.008$) sowie nach 3 Jahren in Bezug auf den Ausgangswert (Konfidenzintervall -0.002 - -0.498; $p=0.049$).

Bei 12 von den insgesamt 17 Patienten kam es zu einem Abfall der NetArea-Werte des sIgE, dabei war bei 4 dieser Patienten nach 3 Jahren Immuntherapie keine Bande gegen Hyaluronidase mehr nachweisbar. Bei 2 Patienten kam es zu einem Anstieg der NetArea-Werte des sIgE im Verlauf der 3 beobachteten Jahre der Immuntherapie. Bei 3 Patienten konnte zu keinem Zeitpunkt eine Bande gegen Hyaluronidase nachgewiesen werden.

Verläufe der sIgE siehe Abbildung 7.

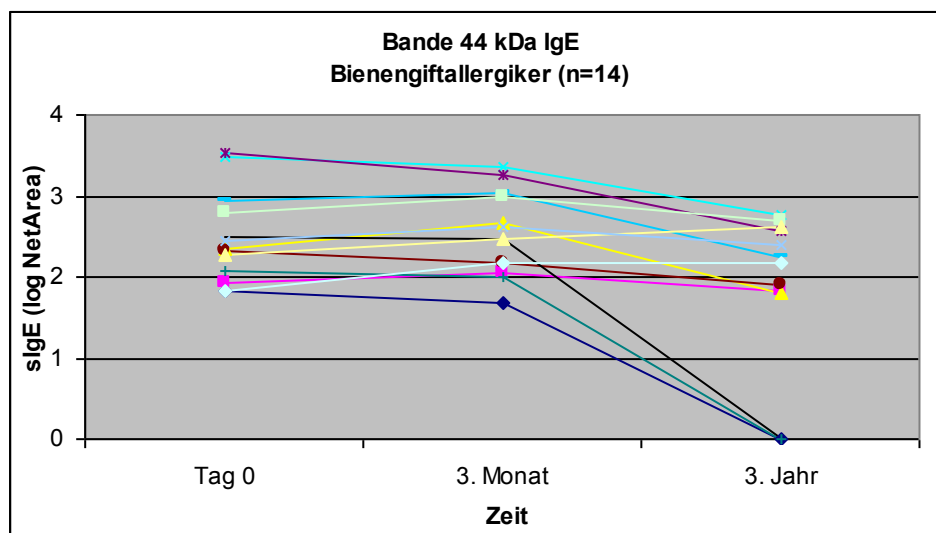


Abbildung 7 Verlauf der sIgE unter SIT aller Bienengiftallergiker für die Bande 44 kDa

5.1.3 Bienengiftallergiker – Bande 100 kDa (Allergen C)

Banden im Bereich von 100 kDa wurden lediglich bei 4 von 17 Patienten beobachtet. Dabei kam es bei allen diesen Patienten zu einer Abnahme der NetArea-Werte des sIgE gegen Allergen C nach 3 Jahren im Vergleich zum Ausgangswert, diese war jedoch nicht signifikant (Konfidenzintervall 0.18 - -0.96; $p=0.12$). Verlauf der NetArea-Werte für die Bande bei 100 kDa siehe Abbildung 8.

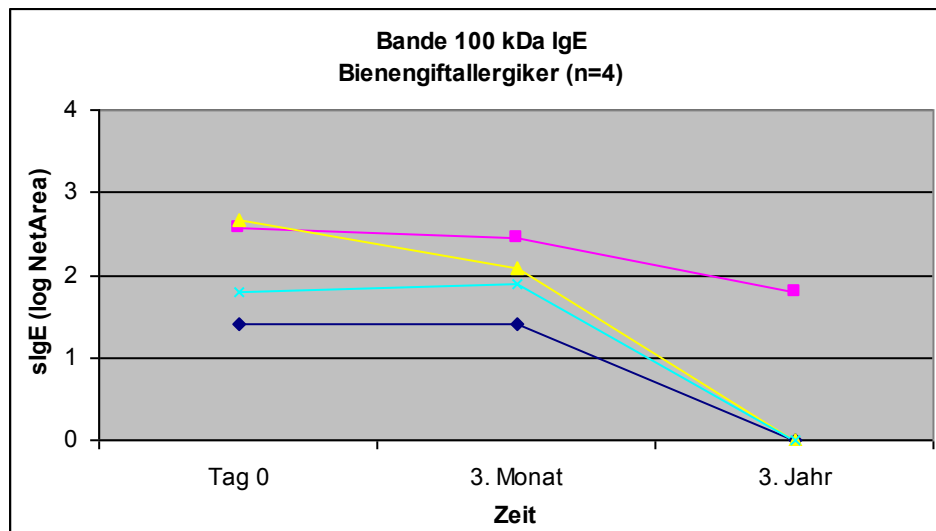


Abbildung 8 Verlauf des sIgE unter SIT aller Bienengiftallergiker für die Bande 100 kDa

			IgE Bienengift								
			Bande 18 kDa			Bande 44 kDa			Bande 100 kDa		
Patient	Allergie	SIT	Tag 0	3. Monat	3. Jahr	Tag 0	3. Monat	3. Jahr	Tag 0	3. Monat	3. Jahr
1	B	B	2.37	2.25	1.78	1.82	1.68				
2	B	B	2.10	2.36	2.05	1.93	2.05	1.82			
3	B	B	2.49	2.53	1.90	2.35	2.67	1.80	1.41	1.40	
4	B	B	3.55	3.30	2.93	3.49	3.35	2.76	2.57	2.44	1.78
5	B	B	2.23		1.71						
6	B	BW	2.02	1.84	1.68						
7	B	B	3.33	2.99	2.13	3.54	3.26	2.56	2.68	2.09	
8	B	B	2.04	1.71		2.31	2.17	1.91			
9	B	B	2.44	2.06		2.11					
10	B	B	2.13	2.44	2.12						
11	B	BW	2.15	2.08	1.77	2.08	1.99				
12	B	B	2.60	2.70	2.02	2.51	2.46				
13	B	B	3.01	3.04	2.38	2.94	3.04	2.24	1.79	1.88	
14	B	B	2.10	2.36	2.25	1.83	2.18	2.18			
15	B	B	2.37	2.56	2.33	2.80	2.99	2.68			
40	BW	BW	2.28	2.58	2.34	2.26	2.46	2.61			
41	BW	BW	2.27	2.51	2.22	2.45	2.61	2.41			

Tabelle 4 Logarithmierte NetArea-Werte IgE für die Banden 18 kDa, 44 kDa, 100 kDa für alle Bienengiftallergiker

5.1.4 Wespengiftallergiker – Bande 23 kDa (Antigen 5)

Während der ersten 3 Monate der Immuntherapie kam es bei den insgesamt 26 Patienten mit Wespengiftallergie zu keiner signifikanten Veränderung der NetArea-Werte des sIgE gegen Antigen 5 (Konfidenzintervall 0.17 - -0.02; $p=0.12$). Zwischen dem 3. Monat und 3. Jahr nahmen die NetArea-Werte signifikant ab (Konfidenzintervall -0.09 - -0.37; $p=0.002$).

Bei 17 von 26 Patienten kam es im Verlauf von 3 Jahren zu einer Abnahme der NetArea-Werte, wobei bei 1 von diesen Patienten nach 3 Jahren SIT keine Bande gegen Antigen 5 mehr nachweisbar war. Bei 9 Patienten nahmen die NetArea-Werte zu.

Insgesamt kam es im Verlauf der 3 beobachteten Jahre zu einer signifikanten Abnahme der Werte (Konfidenzintervall -0.0004 - -0.3248 $p=0.049$). Verlauf der NetArea-Werte der sIgE bei 23 kDa siehe Abbildung 9.

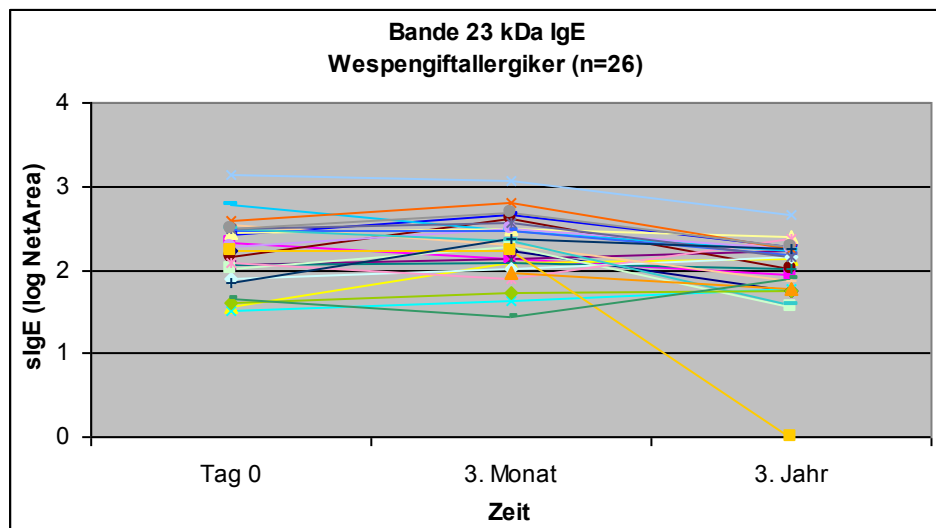


Abbildung 9 Verlauf des sIgE unter SIT aller Wespengiftallergiker für die Bande 23 kDa

5.1.5 Wespengiftallergiker – Bande 35 kDa (Phospholipase A1)

Im Verlauf der ersten 3 Monate unter SIT kam es zu einem signifikanten Anstieg der NetArea-Werte von sIgE gegen Phospholipase A1 (Konfidenzintervall 0.19 - 0.04; $p=0.005$). Nach dem 3. Monat bis zum 3. Jahr nahmen die NetArea-Werte signifikant ab (Konfidenzintervall -0.05 - -0.24; $p=0.006$).

Bei 14 von 26 Patienten war im Verlauf der 3 Jahre insgesamt eine Abnahme der NetArea-Werte zu beobachten. Bei 12 Patienten nahmen die NetArea-Werte zu. Alle Patienten betrachtet, war innerhalb der 3 Jahre keine signifikante Veränderung zu beobachten (Konfidenzintervall 0.08 - -0.13; $p=0.59$). Siehe Abbildung 10.

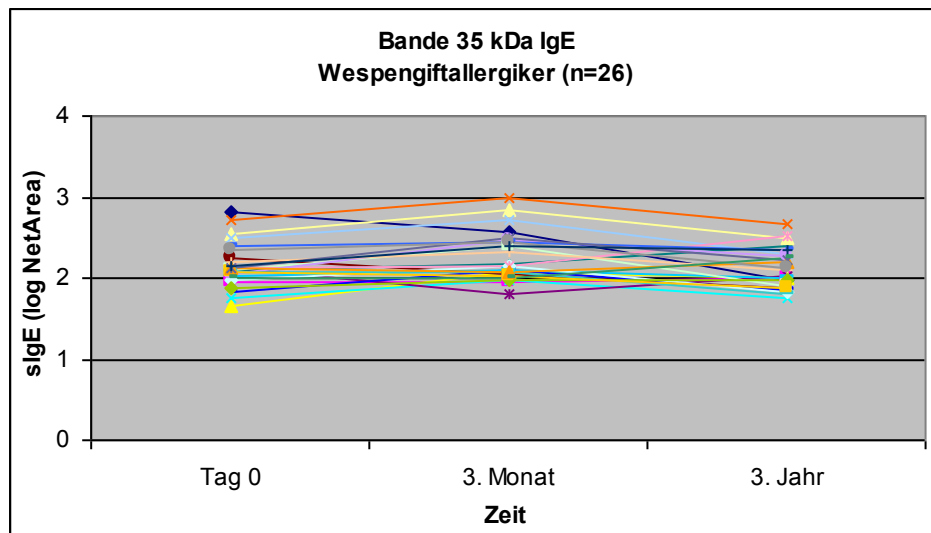


Abbildung 10 Verlauf des sIgE unter SIT aller Wespengiftallergiker für die Bande 35 kDa

5.1.6 Wespengiftallergiker – Bande 44 kDa (Hyaluronidase)

Die Verläufe der NetArea-Werte von sIgE gegen Hyaluronidase (44 kDa) verhielten sich ähnlich, wie die der Werte von sIgE gegen Phospholipase A1; in den ersten 3 Monaten kam es zu einem signifikanten Anstieg (Konfidenzintervall 0.42 - 0.01; $p=0.04$), danach fielen die Werte bis zum 3. Jahr signifikant ab (Konfidenzintervall -0.03 - -0.51; $p=0.03$). Betrachtet man den gesamten Zeitraum - vom Beginn der Immuntherapie bis zum Jahr 3 – dann gibt es keine signifikante Änderung der NetArea-Werte bei der Bande gegen Hyaluronidase (Konfidenzintervall 0.22 - -0.26; $p=0.84$). Bei 9 von insgesamt 26 Patienten nahmen die NetArea-Werte ab, wobei bei 3 von diesen Patienten nach 3 Jahren kein sIgE gegen Hyaluronidase mehr nachweisbar war. Bei 8 von 26 Patienten nahmen die Werte zu. (Vergleiche Abbildung 11). Bei insgesamt 9 Patienten konnte zu keinem Zeitpunkt sIgE gegen Hyaluronidase nachgewiesen werden.

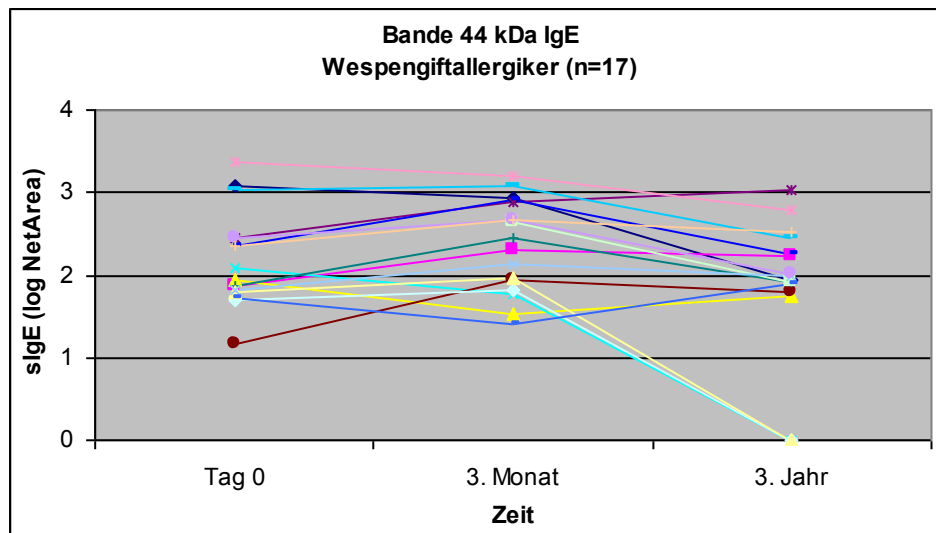


Abbildung 11 Verlauf des sIgE unter SIT aller Wespengiftallergiker für die Bande 44 kDa

			IgE Wespe								
			Bande 23 kDa			Bande 35 kDa			Bande 44 kDa		
Patient	Allergie	SIT	Tag 0	3. Monat	3. Jahr	Tag 0	3. Monat	3. Jahr	Tag 0	3. Monat	3. Jahr
16	W	W	2.24	2.22	1.74	2.81	2.57	1.98	3.08	2.94	1.94
17	W	W	2.32	2.13	1.93	1.95	1.95	1.99			
18	W	W	1.55	2.09	2.12	1.66	2.08	2.01	1.88	2.30	2.22
19	W	W	1.50	1.62	1.77	1.75	1.97	1.75			
20	W	W	2.05	2.12	2.22	2.11	1.81	2.02	1.94	1.52	1.75
21	W	BW	2.16	2.62	2.01	2.24	2.05	1.88	2.08	1.77	
22	W	BW	2.06	2.09	2.01	2.10	2.16	2.38	2.44	2.88	3.02
23	W	W	2.43	2.67	2.28	1.82	2.11	1.85	1.17	1.95	1.80
24	W	W	2.78	2.46	2.22	2.01	2.10	2.00			
25	W	W	1.88	2.02	2.15	1.98	2.15	1.83			
26	W	W	2.01	2.27	1.55	2.09	2.41	1.91	1.87	2.46	1.93
27	W	W	2.45	2.48	2.40	2.53	2.85	2.49	2.34	2.90	2.25
28	W	W	3.13	3.07	2.65	2.50	2.72	2.29	3.04	3.09	2.44
29	W	W	2.09	1.90	2.38	2.12	2.15	2.51	1.69	1.83	
30	W	W	2.27	2.48	2.26	2.06	2.47	2.27		2.63	1.92
31	W	W	2.54	2.30	1.88	2.20	2.32	2.10	1.80	1.97	
32	W	W	2.47	2.47	2.18	2.38	2.45	2.35	1.82	2.14	1.99
33	W	W	2.49	2.36	1.57	2.08	2.08	1.80			
34	W	W	1.60	1.72	1.75	1.88	1.97	1.98			
35	W	W	2.24	2.23		2.07	2.02	1.87			
36	W	W		1.96	1.76	2.12	2.06	2.20			
37	W	W	2.58	2.79	2.25	2.72	2.99	2.68	3.37	3.19	2.79
38	W	W	2.48	2.57	2.16	2.12	2.48	2.22			
39	W	W	2.50	2.67	2.27	2.34	2.44	2.12	2.44	2.68	2.01
40	BW	BW	1.84	2.38	2.24	2.15	2.39	2.34	2.34	2.68	2.52
41	BW	BW	1.65		1.88	2.00	1.99	2.26	1.72	1.39	1.90

Tabelle 5 Logarithmierte NetArea-Werte IgE für die Banden 23 kDa, 35 kDa, 44 kDa für alle Wespengiftallergiker

5.2 Das Verhalten des sIgG4 vor und während der spezifischen Immuntherapie

Wie für das sIgE wurde auch für das sIgG4 den Flächeninhalt unter der Kurve (NetArea) zu den jeweiligen Zeitpunkten für die Einzel-Allergene gemessen und im Folgenden dargestellt. Patienten mit einer Bienen- und Wespengiftallergie wurden wieder für die jeweiligen Banden entweder den Bienengiftallergikern oder den Wespengiftallergikern zugeordnet. Die entsprechenden Werte für die Bienengiftallergiker siehe Tabelle 6, für die Wespengiftallergiker siehe Tabelle 7. In den jeweiligen Tabellen sind wieder die Allergie des Patienten (Bienengiftallergie (B), Wespengiftallergie (W), Bienen- und Wespengiftallergie (BW)), die erfolgte Hyposensibilisierungsbehandlung (SIT mit Bienengift (B), mit Wespengift (W), mit Bienen- und Wespengift (BW)) sowie die logarithmierten NetArea-Werte für sIgG4 für die jeweiligen Banden zu den entsprechenden Zeitpunkten angegeben.

5.2.1 Bienengiftallergiker – Bande 18 kDa (Phospholipase A2)

In den ersten 3 Monaten der Immuntherapie kommt es zu einem signifikanten Anstieg der NetArea-Werte des IgG4 gegen Phospholipase A2 (Konfidenzintervall 0.70 - 0.37; $p < 0.001$), während es vom 3. Monat bis zum 3. Jahr zu keiner signifikanten Veränderung mehr kommt (Konfidenzintervall 0.26 - -0.16; $p = 0.63$). Über den gesamten Zeitraum betrachtet (Tag 0 bis 3. Jahr), ist der Anstieg der NetArea-Werte des sIgG4 gegen Phospholipase A2 signifikant (Konfidenzintervall 0.77 - 0.33; $p < 0.001$).

Bei 15 von insgesamt 17 Patienten nahmen die NetArea-Werte des sIgG4 gegen die Phospholipase A2 im Verlauf von 3 Jahren zu, bei 2 Patienten kam es zu einer Abnahme der Werte. Bei einem Patienten war eine Bande gegen Phospholipase erst im Verlauf der Immuntherapie nach 3 Monaten nachweisbar. Verläufe der NetArea-Werte des sIgG4 gegen Phospholipase siehe Abbildung 12.

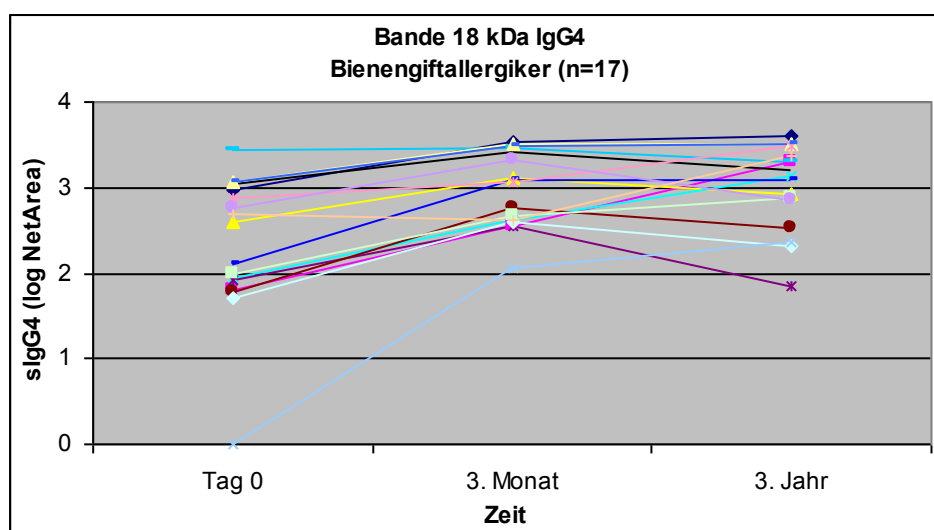


Abbildung 12 Verlauf des sIgG4 unter SIT aller Bienengiftallergiker für die Bande 18 kDa

5.2.2 Bienengiftallergiker – Bande 44 kDa (Hyaluronidase)

Wie schon für den Verlauf der NetArea-Werte des sIgG4 gegen Phospholipase A2 beschrieben, verhält es sich mit dem Verlauf der NetArea-Werte des sIgG4 gegen Hyaluronidase; in den ersten 3 Monaten kommt es zu einem signifikanten Anstieg der Werte (Konfidenzintervall 0.70 - 0.07, $p=0.02$), während der weitere Anstieg bis zum 3. Jahr nicht mehr signifikant ist (Konfidenzintervall 0.28 - -0.11; $p=0.36$). Über den gesamten betrachteten Zeitraum (vom Tag 0 bis zum 3. Jahr) ist der Anstieg signifikant (Konfidenzintervall 0.61 - 0.05; $p=0.02$). Verläufe der NetArea-Werte des IgG4 siehe Abbildung 13.

Bei 7 von 17 Patienten kam es erst im Verlauf der Immuntherapie zum Auftreten von Banden gegen Hyaluronidase, bei einem Patienten konnten zu keinem Zeitpunkt IgG4-Banden gegen Hyaluronidase nachgewiesen werden. Bei diesem Patienten waren auch keine IgE-Banden gegen Hyaluronidase nachweisbar.

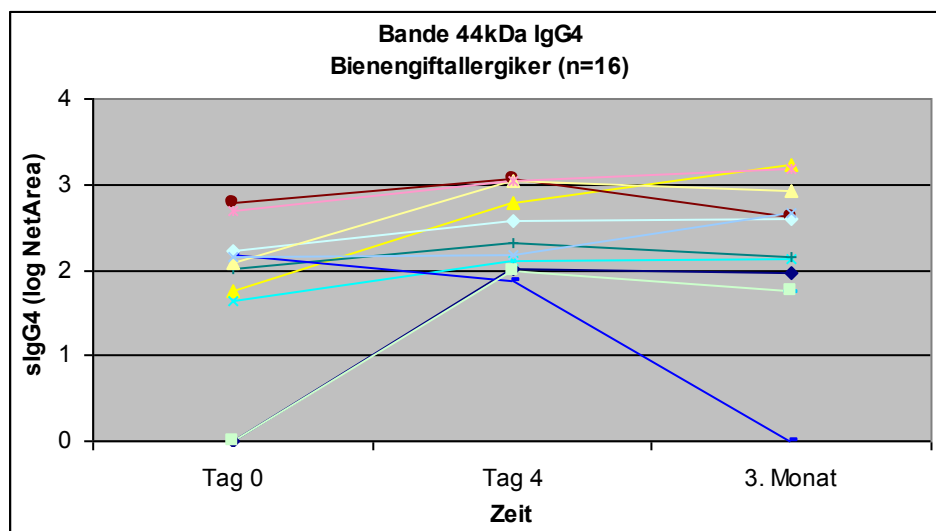


Abbildung 13 Verlauf des sIgG4 unter SIT aller Bienengiftallergiker für die Bande 44 kDa

5.2.3 Bienengiftallergiker – Bande 100 kDa (Allergen C)

Nur bei insgesamt einem Patienten war eine Bande bei 100 kDa nachweisbar, und zwar erst ab dem 3. Monat, bis zum dritten Jahr gab es keine Veränderung des Wertes. Siehe Abbildung 14.

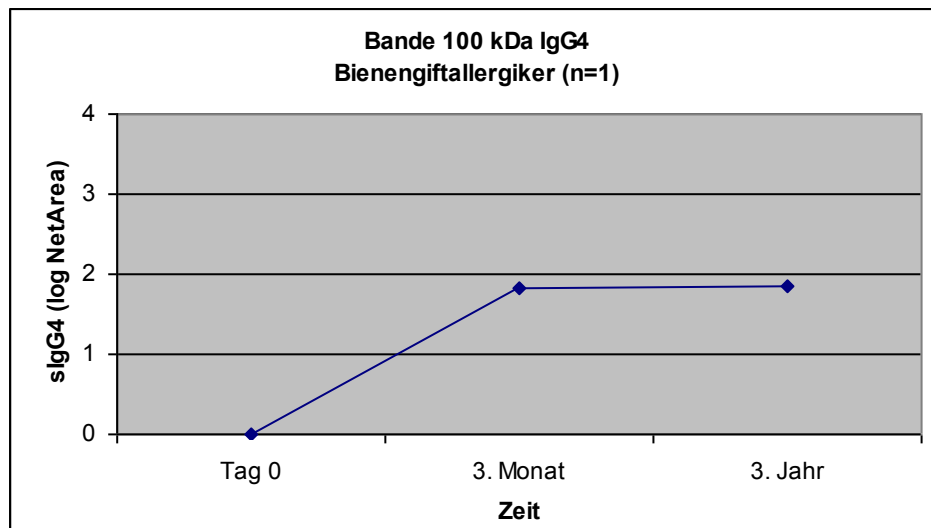


Abbildung 14 Verlauf des sIgG4 unter SIT aller Bienengiftallergiker für die Bande 100 kDa

			IgG4 Biene								
			Bande 18 kDa			Bande 44 kDa			Bande 100 kDa		
Patient	Allergie	SIT	Tag 0	3. Monat	3. Jahr	Tag 0	3. Monat	3. Jahr	Tag 0	3. Monat	3. Jahr
1	B	B	2.96	3.54	3.59		2.02	1.96			
2	B	B	1.81	2.55	3.29			2.77			
3	B	B	2.60	3.10	2.93	1.76	2.77	3.22		1.82	1.84
4	B	B	1.95	2.62	3.14	1.63	2.10	2.13			
5	B	B	1.91	2.55	1.85			1.94			
6	B	BW	1.78	2.77	2.53			2.81			
7	B	B	3.05	3.42	3.20	2.79	3.06	2.63			
8	B	B	2.11	3.09	3.09	2.01	2.32	2.15			
9	B	B	3.44	3.47	3.31	2.17	1.87				
10	B	B	1.71	2.60	2.32						
11	B	BW	1.98	2.67	2.87			1.74			
12	B	B	3.07	3.51	3.50	2.23	2.58	2.60			
13	B	B		2.05	2.36		2.00	1.75			
14	B	B	2.89	3.05	3.48			1.86			
15	B	B	2.76	3.31	2.85	2.07	3.04	2.91			
40	BW	BW	2.68	2.61	3.37	2.15	2.18	2.68			
41	BW	BW	3.07	3.48	3.52	2.70	3.04	3.19			

Tabelle 6 Logarithmierte NetArea-Werte IgG4 für die Banden 18 kDa, 44 kDa, 100 kDa für alle Bienengiftallergiker

5.2.4 Wespengiftallergiker – Bande 23 kDa (Antigen 5)

Die NetArea-Werte des sIgG4 stiegen in allen beobachteten Zeiträumen signifikant an; nach 3 Monaten (Konfidenzintervall 0.82 - 0.53; $p < 0.001$), zwischen dem 3. Monat und dem 3. Jahr (Konfidenzintervall 0.42 - 0.14; $p < 0.001$) und nach 3 Jahren ausgehend vom Ausgangswert (Konfidenzintervall 1.01 - 0.74; $p < 0.001$). Verlauf siehe Abbildung 15.

Dabei kam es bei allen 26 Patienten mit einer Wespengiftallergie zu einem Anstieg der NetArea-Werte des IgG4 im Vergleich zum Ausgangswert am Tag 0, wobei bei 3 Patienten sIgG4 erst im Verlauf der Immuntherapie nachgewiesen werden konnten.

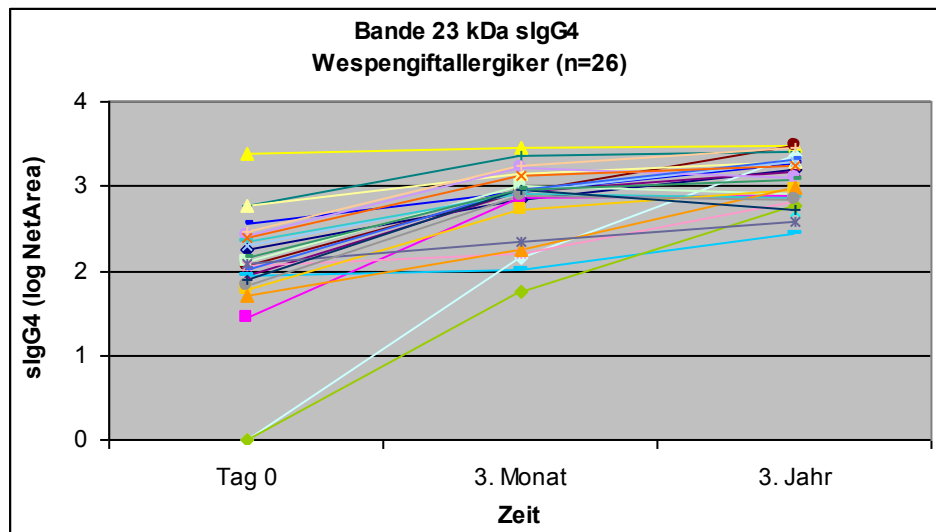


Abbildung 15 Verlauf des sIgG4 unter SIT aller Wespengiftallergiker für die Bande 23 kDa

5.2.5 Wespengiftallergiker – Bande 35 kDa (Phospholipase A1)

Wie die Verläufe der NetArea-Werte des IgG4 gegen Antigen 5 (Bande 23 kDa) verhalten sich auch die Verläufe der NetArea-Werte des IgG4 gegen Phospholipase A1; sowohl bis zum 3. Monat (Konfidenzintervall 0.59 - 0.27; $p < 0.001$), als auch zwischen 3. Monat und 3. Jahr (Konfidenzintervall 0.40 - 0.15; $p < 0.001$) und vom Tag 0 bis zum 3. Jahr (Konfidenzintervall 0.82 - 0.50; $p < 0.001$) sind die Anstiege der Werte signifikant (siehe auch Abbildung 16).

Bei 25 von 26 Patienten kommt es zu einem Anstieg der NetArea-Werte des IgG4 gegen Phospholipase A1 im Verlauf der 3 Jahre, wobei bei 2 Patienten erst im Verlauf der Immuntherapie IgG4-Banden auftreten, bei einem Patienten sinkt der NetArea-Wert des IgG4 gegen Phospholipase A1 im Verlauf der 3 Jahre.

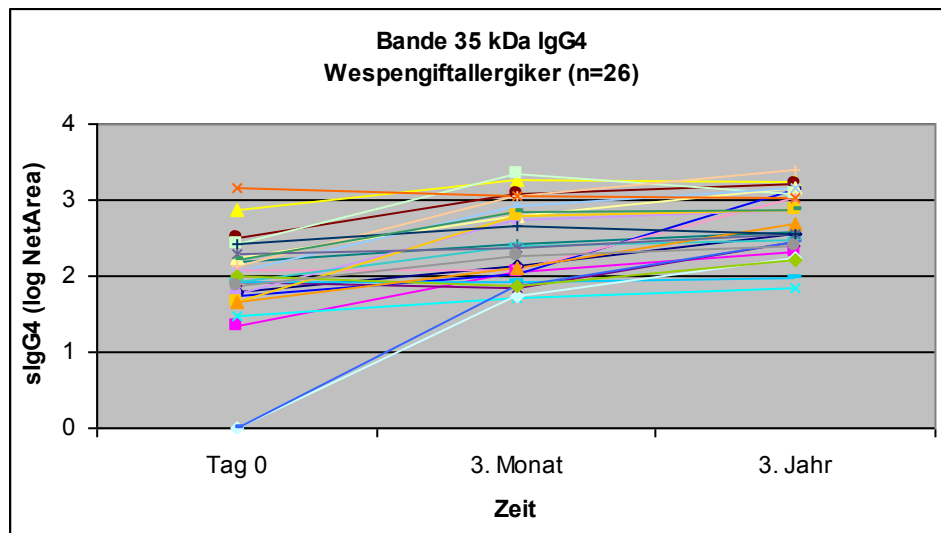


Abbildung 16 Verlauf des sIgG4 unter SIT aller Wespengiftallergiker für die Bande 35 kDa

5.2.6 Wespengiftallergiker – Bande 44 kDa (Hyaluronidase)

Wie bereits für die Verläufe der NetArea-Werte des IgG4 gegen Antigen 5 (Bande 23 kDa) und Phospholipase A1 (Bande 35 kDa) beschrieben, verhält es sich für die Verläufe der NetArea-Werte des IgG4 gegen Hyaluronidase; in allen beobachteten Zeiträumen kam es zu einem signifikanten Anstieg der IgG4-Werte. Tag 0/3. Monat (Konfidenzintervall 1.05 - 0.34; $p=0.002$), 3. Monat/3. Jahr (Konfidenzintervall 0.74 - 0.27; $p<0.001$), Tag 0/3. Jahr (Konfidenzintervall 0.97 - 0.54; $p<0.01$). Vergleiche Abbildung 17.

Bei 22 von 26 Patienten kam es im Verlauf der Immuntherapie zu einem Anstieg der NetArea-Werte des IgG4 gegen Hyaluronidase, wobei bei 14 Patienten erst im Verlauf Antikörper-Allergenbanden bei 44 kDa auftraten, bei 4 Patienten waren zu keinem Zeitpunkt IgG4-Banden gegen Hyaluronidase nachweisbar.

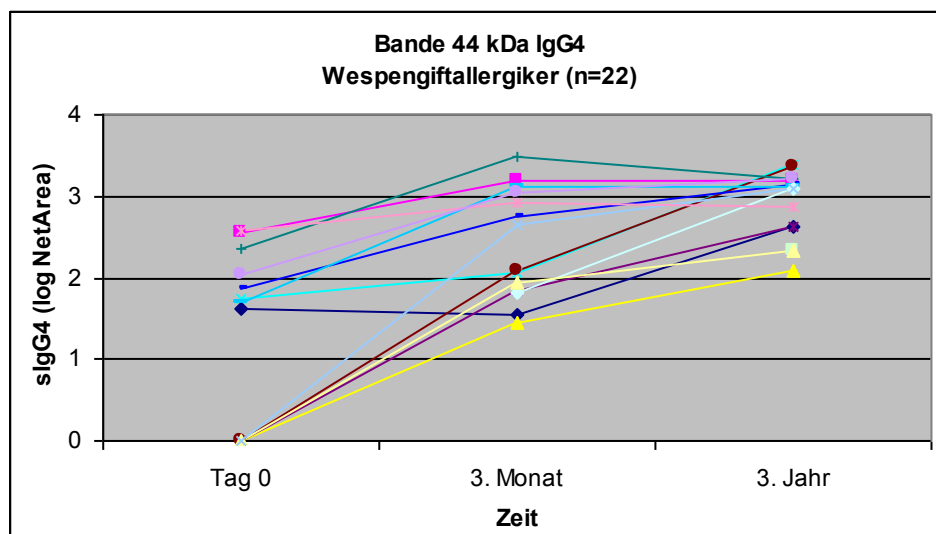


Abbildung 17 Verlauf des sIgG4 unter SIT aller Wespengiftallergiker für die Bande 44 kDa

			IgG4 Wespe								
			Bande 23 kDa			Bande 35 kDa			Bande 44 kDa		
Patient	Allergie	SIT	Tag 0	3. Monat	3. Jahr	Tag 0	3. Monat	3. Jahr	Tag 0	3. Monat	3. Jahr
16	W	W	2.25	2.85	3.20	1.78	2.12	2.56	1.62	1.55	2.63
17	W	W	1.45	2.86	2.88	1.35	2.04	2.32			2.21
18	W	W	3.38	3.46	3.48	2.87	3.27	3.24	2.54	3.20	3.19
19	W	W			2.70	1.47		1.84			
20	W	W	1.94	2.93	3.18	1.91	1.85	2.45		1.44	2.09
21	W	BW	2.06	2.94	3.48	2.50	3.09	3.22	1.74	2.06	3.40
22	W	BW	2.78	3.37	3.40	2.18	2.41	2.59		1.85	2.64
23	W	W	2.55	2.93	3.27	1.74	2.04	3.12		2.10	3.37
24	W	W	1.93	2.00	2.43	1.93		1.97			
25	W	W		2.15	3.35		1.73	2.24			2.63
26	W	W	2.11	3.01	2.91	2.42	3.34	3.08	2.35	3.48	3.21
27	W	W	2.76	3.16	3.30	2.24	2.78	3.16	1.86	2.74	3.13
28	W	W	2.31	2.93	3.28	2.04	2.93	3.15	1.68	3.12	3.11
29	W	W	2.05	2.20	2.81	2.08	2.09	3.03			2.80
30	W	W	2.42	3.21	3.11	1.75	2.73	2.87			2.02
31	W	W	2.46	3.25	3.45	2.12	3.04	3.38		1.80	3.09
32	W	W	2.00	2.95	3.32		1.87	2.44			2.34
33	W	W	2.35	2.91	2.85	1.93	2.40	2.46		1.94	2.33
34	W	W		1.76	2.78	2.01	1.88	2.21			
35	W	W	1.77	2.72	2.97	1.66	2.80	2.86			3.23
36	W	W	1.71	2.26	2.97	1.67	2.09	2.69			2.05
37	W	W	2.40	3.12	3.25	3.14	3.05	3.02		2.65	3.10
38	W	W	2.09	2.35	2.58	2.30	2.37	2.54			2.68
39	W	W	1.83	2.89	2.85	1.86	2.25	2.39			
40	BW	BW	1.89	2.95	2.72	2.42	2.67	2.56	2.58	2.93	2.87
41	BW	BW	2.16	2.96	3.09	2.20	2.85	2.87	2.04	3.04	3.21

Tabelle 7 Logarithmierte NetArea-Werte IgG4 für die Banden 23 kDa, 35 kDa, 44 kDa für alle Wespengiftallergiker

5.3 Verhältnis IgE/IgG4 vor und nach 3 Jahren spezifischer Immuntherapie

Für alle Patienten sowie jedes Einzel-Allergen wurden die Verhältnisse sIgE/sIgG4 berechnet und der Verlauf über 3 Jahre SIT dargestellt. Anschließend wurden die Verläufe IgE/IgG4 der Patienten, welche während oder nach Abschluss der SIT auf ein Stichereignis reagiert hatten, mit denen, welche keine Reaktion auf ein Stichereignis hatten, auf signifikante Unterschiede verglichen.

5.3.1 Bienengiftallergiker – Bande 18 kDa (Phospholipase A2)

Bei allen Bienengiftallergikern nahm das Verhältnis sIgE/sIgG4 im Verlauf der 3 beobachteten Jahre SIT ab, d.h. nach 3 Jahren Immuntherapie waren die gemessenen NetArea-Werte für sIgG4 grösser als die Werte für sIgE. Zu erwähnen ist dabei, dass die

slgG4-Werte bei 9 von 17 Patienten bereits vor Beginn der SIT grösser waren, als die entsprechenden Werte für slgE.

Das Verhältnis von slgE/slG4 im Verlauf der 3 Jahre war unabhängig davon, ob Stichereignisse mit allergischen Reaktionen einhergingen oder nicht; es fanden sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Verhältnisses slgE/slG4.

5.3.2 Bienengiftallergiker – Bande 44 kDa (Hyaluronidase)

Bei 13 von 17 Patienten nahm das Verhältnis slgE/slG4 im Verlauf der 3 Jahre ab, wobei bei 2 Patienten die slgG4-Werte zu Beginn der SIT bereits grösser waren als die slgE-Werte. Bei einem dieser Patienten war das Verhältnis – trotz gesamthafter Abnahme - nach 3 Jahren noch grösser 1, d.h. der slgE-Wert war grösser als der slgG4-Wert.

Bei einem Patienten (Nr. 14) waren über die 3 Jahre NetArea-Werte für slgE nachweisbar, wobei der Wert nach 3 Jahren grösser war, als der Ausgangswert. Spezifisches IgG4 war lediglich im 3. Jahr nachweisbar, der Wert war jedoch kleiner als der Wert für slgE im 3. Jahr. Ein Stichereignis hatte nicht stattgefunden.

Bei einem Patienten (Nr. 6) konnte während der SIT lediglich nach 3 Monaten slgE nachgewiesen werden, slgG4 konnte erst nach dem 3. Monat gemessen werden, war jedoch höher als der IgE-Wert. Auch bei diesem Patienten wurde kein Feldstich dokumentiert.

Bei zwei Patienten (Nr. 5 und 10) konnte zu keinem Zeitpunkt slgE nachgewiesen werden, jedoch bei einem Patienten slgG4, dies aber erst im 3. Jahr der SIT. Bei dem anderen Patienten konnte auch zu keinem Zeitpunkt slgG4 nachgewiesen werden. Beide Patienten waren jedoch ohne Feldstich im beobachteten Zeitraum.

Auch hier fanden sich bezüglich der Verläufe slgE/slG4 im Verlauf der 3 Jahre keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten mit toleriertem und nicht toleriertem Feldstich.

5.3.3 Bienengiftallergiker – Bande 100 kDa (Allergen C)

Da lediglich bei einem von 17 Patienten slgG4 im Verlauf der SIT nachweisbar war, war eine Berechnung der Verhältnisse slgE/slG4 nicht möglich.

5.3.4 Wespengiftallergiker – Bande 23 kDa (Antigen 5)

Bei 25 von 26 Patienten kam es innerhalb der 3 Jahre SIT zu einer Abnahme des Verhältnisses slgE/slG4. Bei allen Patienten war das Verhältnis slgE/slG4 nach 3 Jahren kleiner 1, d.h. die Werte für slgG4 waren grösser als die Werte für slgE zu diesem Zeitpunkt.

Bei einem Patienten kam es im Verlauf der 3 Jahre zu einem diskreten Anstieg des Verhältnisses slgE/slgG4 . Bereits vor Hyposensibilisierung war der Verhältniswert kleiner 1, und war dies, trotz Anstieg des Wertes, auch noch nach 3 Jahren.

Das Verhältniss von slgE/slgG4 im Verlauf der 3 Jahre zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen Patienten, welche einen Feldstich tolerierten und Patienten mit allergischer Reaktion nach Feldstich.

5.3.5 Wespengiftallergiker – Bande 35 kDa (Phospholipase A1)

Bei 23 von 26 Patienten nahm das Verhältnis slgE/slgG4 innerhalb von 3 Jahren ab. Bei 3 Patienten kam es im Verlauf zu einer diskreten Zunahme des Verhältnisses, wobei dieses zu jedem Zeitpunkt kleiner 1 war. Insgesamt war das Verhältnis slgE/slgG4 bei 24 von 25 Patienten nach 3 Jahren kleiner 1. Bei einem Patienten war es sowohl zu Beginn der SIT als auch nach 3 Jahren grösser 1, wobei es im Verlauf der 3 Jahre zu einer Abnahme des Verhältnisses kam. Dieser Patient tolerierte im 3. Jahr der SIT ein Stichereignis problemlos.

Auch hier war das Verhältnis slgE/slgG4 im Verlauf der 3 Jahre unabhängig davon, ob ein Stichereignis vom Patienten toleriert wurde oder nicht; es fanden sich keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Verhältnisses slgE/slgG4 .

5.3.6 Wespengiftallergiker – Bande 44 kDa (Hyaluronidase)

Bei 11 Patienten konnte kein oder nur zu einzelnen Zeitpunkten slgE und kein slgG4 in diesem Bereich gemessen werden. Aufgrund dessen konnten lediglich von 15 Patienten die Verhältnisse slgE/slgG4 betrachtet werden. Bei allen 15 Patienten zeigte sich im Verlauf der 3 Jahre ein Abnahme des Verhältnisses. Bei einem Patienten war das Verhältnis slgE/slgG4 nach 3 Jahren grösser 1 (ein Stichereignis fand nicht statt), bei allen anderen war der NetArea-Wert für slgG4 nach 3 Jahren grösser als der NetArea-Wert für slgE .

Ebenso wie für die o.g. Allergene fanden sich auch hier keine signifikanten Unterschiede in den Verläufen der Verhältnisse slgE/slgG4 zwischen Patienten ohne und mit allergischer Reaktion nach Feldstich.

5.4 Spezielle Betrachtung der Patienten mit einem erfolgten Feldstich hinsichtlich der Verläufe der spezifischen Immunglobuline E und G4

Von den insgesamt 41 Patienten, von welchen die entsprechenden Seren untersucht wurden, erlitten insgesamt 20 Patienten während und/oder nach Abschluss der SIT einen Feldstich. Die Verläufe der spezifischen Immunglobuline dieser Patienten sollen nun im folgenden dargestellt werden.

Zudem erfolgte eine Unterscheidung zwischen immunologisch geschützten und nicht geschützten Patienten. Folgende Parameter wurden für die Unterscheidung „geschützt - nicht geschützt“ verwendet:

- Geschützte Patienten weisen nach 3 Jahren Immuntherapie zumindest gegen all jene Allergenbanden eine slgG4-Reaktivität auf, die vor Therapie slgE-positiv war.
- Nicht geschützte Patienten weisen nach 3 Jahren Immuntherapie einen isolierten Mangel an slgG4-Reaktivität bei einer beliebigen Allergenbande auf, die vor Therapiebeginn slgE-positiv war.
- Geschützte Patienten haben nach 3 Jahren Immuntherapie ein Verhältnis slgE/slG4 < 1.

5.4.1 Patienten mit Bienenstich

10 Patienten wurden im Verlauf oder nach Beendigung der SIT von einer Biene gestochen. Die entsprechenden logarithmierten NetArea-Werte für slgE siehe Tabelle 8, für slgG4 siehe Tabelle 9. In den jeweiligen Tabellen sind die Allergie des Patienten (Bienengiftallergie (B), Bienen- und Wespengiftallergie (BW)), die erfolgte Hyposensibilisierungsbehandlung (SIT mit Bienengift (B), mit Bienen- und Wespengift (BW)), die Reaktion auf den erfolgten Feldstich (reagiert (R), nicht reagiert (NR)) sowie die logarithmierten NetArea-Werte für die jeweiligen Banden zu den entsprechenden Zeitpunkten angegeben.

				IgE Biene								
				Bande 18 kDa			Bande 44 kDa			Bande 100 kDa		
Patient	Allergie	SIT	Reaktion	Tag 0	3. Monat	3. Jahr	Tag 0	3. Monat	3. Jahr	Tag 0	3. Monat	3. Jahr
4	B	B	R	3.55	3.30	2.93	3.49	3.35	2.76	2.57	2.44	1.78
7	B	B	NR	3.33	2.99	2.13	3.54	3.26	2.56	2.68	2.09	
8	B	B	NR	2.04	1.71		2.31	2.17	1.91			
10	B	B	NR	2.13	2.44	2.12						
11	B	BW	NR	2.15	2.08	1.77	2.08	1.99				
12	B	B	NR	2.60	2.70	2.02	2.51	2.46				
13	B	B	NR	3.01	3.04	2.38	2.94	3.04	2.24	1.79	1.88	
15	B	B	NR	2.37	2.56	2.33	2.80	2.99	2.68			
40	BW	BW	R	2.28	2.58	2.34	2.26	2.46	2.61			
41	BW	BW	NR	2.27	2.51	2.22	2.45	2.61	2.41			

Tabelle 8 Logarithmierte NetArea-Werte IgE für die Banden 18 kDa, 44 kDa, 100 kDa für alle Bienengiftallergiker mit Feldstich (Biene)

				IgG4 Biene								
				Bande 18 kDa			Bande 44 kDa			Bande 100 kDa		
Patient	Allergie	SIT	Reaktion	Tag 0	3. Monat	3. Jahr	Tag 0	3. Monat	3. Jahr	Tag 0	3. Monat	3. Jahr
4	B	B	R	1.95	2.62	3.14	1.63	2.10	2.13			
7	B	B	NR	3.05	3.42	3.20	2.79	3.06	2.63			
8	B	B	NR	2.11	3.09	3.09	2.01	2.32	2.15			
10	B	B	NR	1.71	2.60	2.32						
11	B	BW	NR	1.98	2.67	2.87			1.74			
12	B	B	NR	3.07	3.51	3.50	2.23	2.58	2.60			
13	B	B	NR		2.05	2.36		2.00	1.75			
15	B	B	NR	2.76	3.31	2.85	2.07	3.04	2.91			
40	BW	BW	R	2.68	2.61	3.37	2.15	2.18	2.68			
41	BW	BW	NR	3.07	3.48	3.52	2.70	3.04	3.19			

Tabelle 9 Logarithmierte NetArea-Werte IgG4 für die Banden 18 kDa, 44 kDa, 100 kDa für alle Bienengiftallergiker mit Feldstich (Biene)

Insgesamt tolerierten 8 Patienten einen bzw. mehrere Stiche problemlos. 2 Patienten erlitten Reaktionen, die sie veranlasste, Notfallmedikamente einzusetzen.

Betrachtet man die Verläufe der spezifischen Immunglobuline E und G4 getrennt voneinander, ergaben sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Patienten mit toleriertem Feldstich und denen mit einer Reaktion auf Feldstich.

Bei allen Patienten, welche einen Feldstich tolerierten, gab es einen Abfall der slgE-NetArea-Werte, welche für die Bande 18 kDa sogar signifikant (Konfidenzintervall $-0.06 - -0.74$; $p=0.026$) war. Bei den beiden Patienten mit einer Reaktion nach Feldstich gab es hinsichtlich der slgE-Werte verschiedene Verläufe, bei einer Patientin fielen die NetArea-Werte während der SIT ab, bei der anderen Patientin kam es zu einem diskreten Anstieg der Werte. Hinsichtlich des slgG4s konnte bei allen Patienten, sowohl denen mit toleriertem Feldstich als auch denen mit folgenden Reaktionen, ein Anstieg der NetArea-Werte beobachtet werden. Bei den Patienten mit toleriertem Feldstich war dieser signifikant (18 kDa: Konfidenzintervall $0.76 - 0.22$; $p=0.004$; 44 kDa: Konfidenzintervall $1.37 - 0.06$; $p=0.04$;). Aufgrund der kleinen Fallzahl konnte bei den Patienten mit Reaktion auf Feldstich keine Signifikanzprüfung durchgeführt werden.

Bezüglich der unter 5.4 genannten Kriterien hinsichtlich des immunologischen Schutzes, waren 6 der 10 Patienten, welche einen bzw. mehrere Feldstiche tolerierten, auch nach o.g. Aussagen im Immunoblot geschützt.

2 Patienten waren gemäß den Immunoblotuntersuchungen nicht geschützt, tolerierten einen Feldstich jedoch ohne Probleme.

Diese sollen hier mit ihren immunologischen Parametern dargestellt werden.

Patient Nr. 7 tolerierte sowohl 6 als auch 8 Jahre nach Beginn der SIT (Dauer der SIT insgesamt 8 Jahre) ein Stichereignis. Er wies im Bereich der Allergenbande 100 kDa einen

isolierten Mangel an sIgG4 auf, zu Beginn der SIT konnte jedoch sIgE im Bereich dieser Bande gemessen werden.

Verläufe der Immunglobuline siehe folgende 3 Abbildungen.

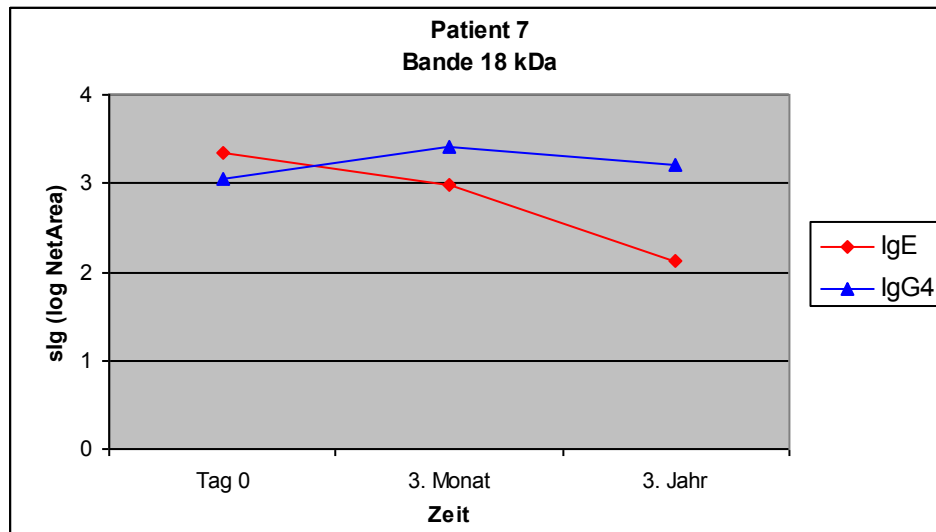


Abbildung 18 Verläufe sIgE und sIgG4 von Patient 7, Bande 18 kDa

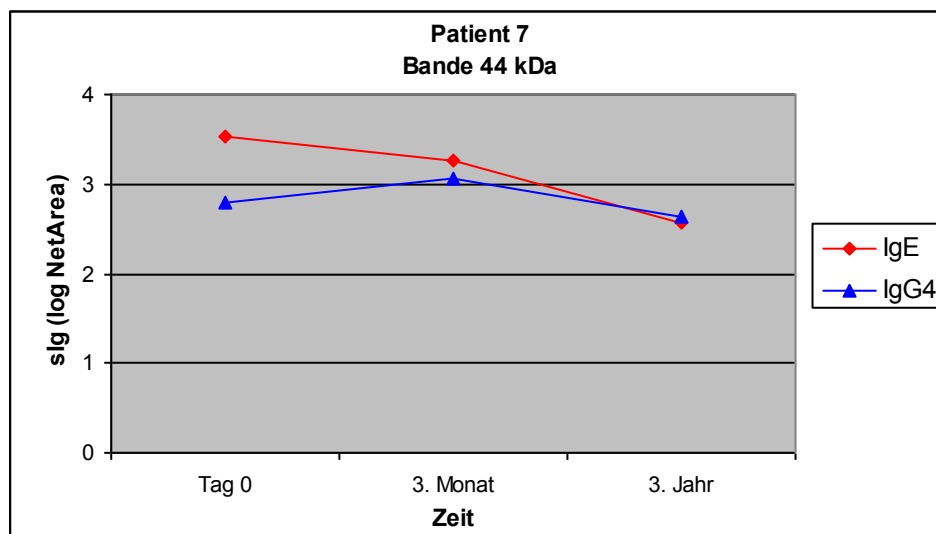


Abbildung 19 Verläufe sIgE und sIgG4 von Patient 7, Bande 44 kDa

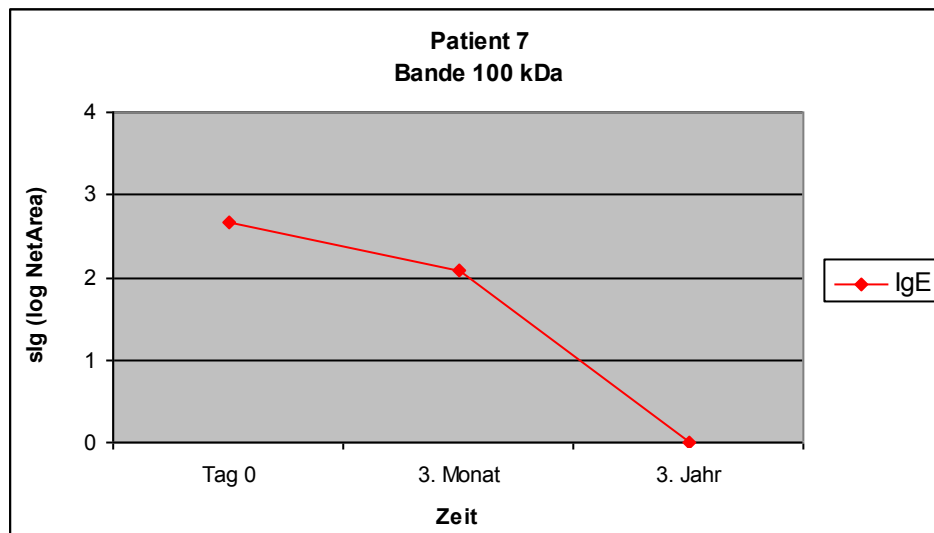


Abbildung 20 Verlauf slgE von Patient 7, Bande 100 kDa

Patient Nr. 13 erlitt 5 ½ Jahre nach Beginn der SIT (Dauer der SIT 5 ¾ Jahre) einen Feldstich, welche ohne Reaktion toleriert wurde.

Auch er weist einen isolierten Mangel an slgG4 im Bereich der Allergenbande 100 kDa auf, bei welcher vor SIT slgE messbar war. Zudem kommt es im Verlauf der SIT zwar zu einem Abfall der slgE sowie zu einem Anstieg des slgG4 im Bereich der Allergenbanden 23 kDa und 35 kDa, das Verhältnis slgE/slG4 ist jedoch im Bereich beider Allergenbanden grösser 1. Verlauf der Immunglobuline siehe Abbildung 21-23.

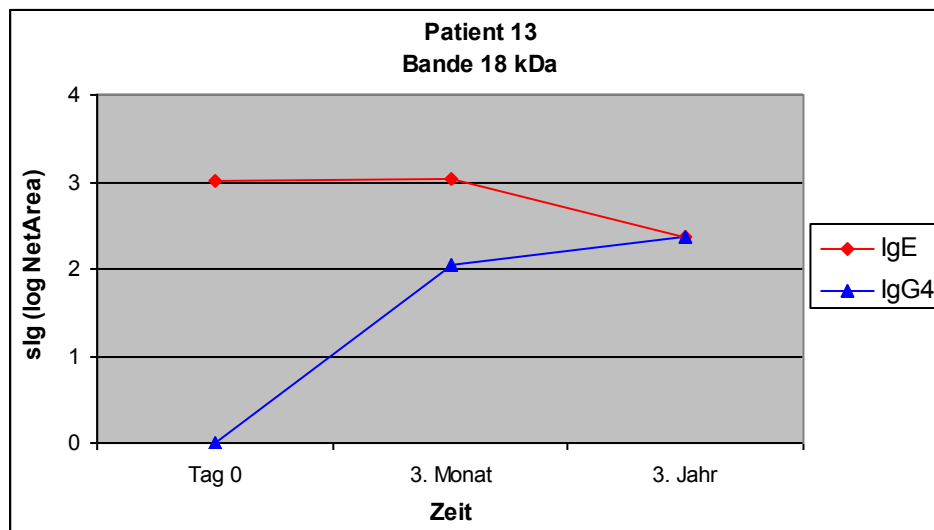


Abbildung 21 Verläufe slgE und slgG4 von Patient 13, Bande 18 kDa

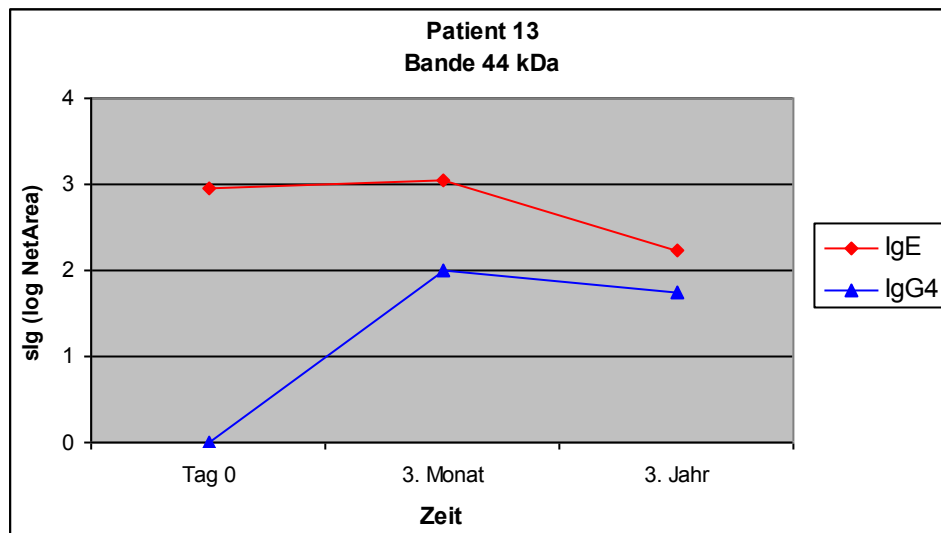


Abbildung 22 Verläufe sIgE und sIgG4 von Patient 13, Bande 44 kDa

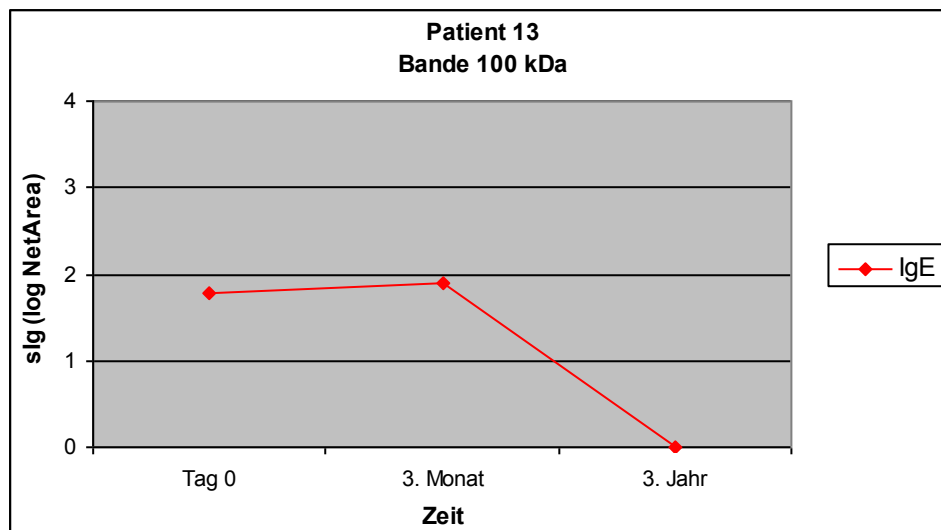


Abbildung 23 Verlauf sIgE von Patient 13, Bande 100 kDa

Wie bereits vorherig erwähnt, wurden 2 Patienten während bzw. nach Abschluss der SIT von einer Biene gestochen und zeigten Reaktionen, welche sie zum Einsatz von Notfallmedikamenten (inklusive Adrenalin) veranlasste. Objektive Zeichen einer systemischen Reaktion konnten durch einen Arzt jedoch nicht verifiziert werden. Gemäß ihren immunologischen Parametern wäre eine Patientin (Nr. 4) nach o.g. Kriterien nicht geschützt, die andere (Nr. 40) jedoch geschützt gewesen. Sie sollen an dieser Stelle mit ihren Immunoblotuntersuchungen dargestellt werden.

Patientin Nr. 4 erlitt einen Feldstich 7 Jahre nach Beginn (3 Jahren nach Beendigung) der SIT. Nach dem Stich fühlte sie sich unwohl und klagte über ein Schwellungsgefühl im Gesicht. Sie applizierte sich Adrenalin subkutan. Eine systemische Reaktion konnte von einem Arzt jedoch nicht objektiviert werden.

In den Immunoblotuntersuchungen zeigt sich ein isolierter Mangel an sIgG4 im Bereich der Allergenbande 100 kDa, bei vorhandenem sIgE. Zudem ist im Bereich der Bande 44 kDa das Verhältnis sIgE/sIgG4 zu jedem gemessenen Zeitpunkt grösser 1. Verläufe der Immunglobuline siehe Abbildung 24-26.

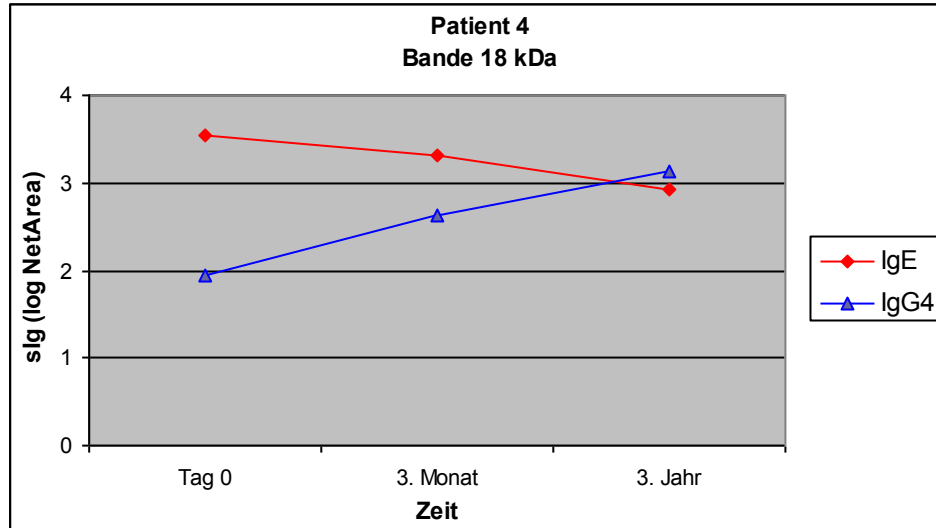


Abbildung 24 Verläufe sIgE und sIgG4 von Patient 4, Bande 18 kDa

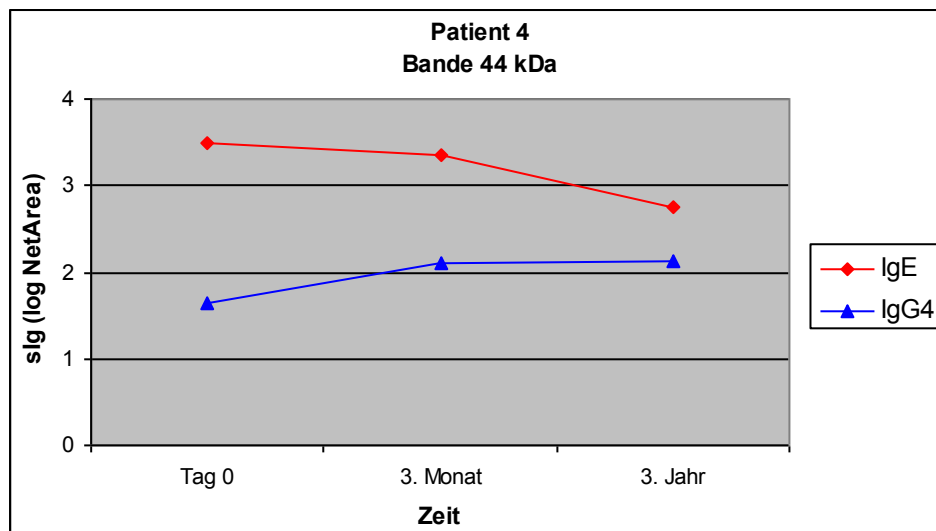


Abbildung 25 Verläufe sIgE und sIgG4 von Patient 4, Bande 44 kDa

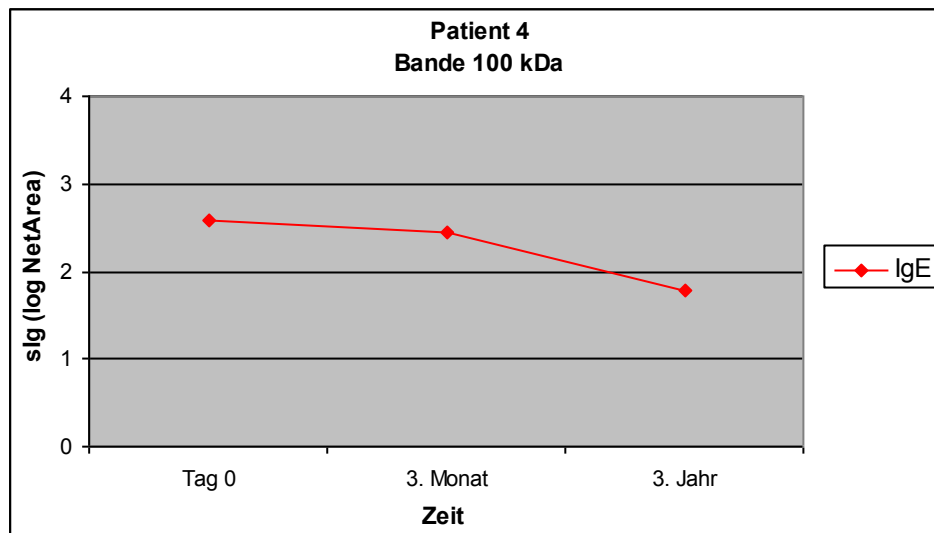


Abbildung 26 Verlauf sIgE von Patient 4, Bande 100 kDa

Patientin Nr. 40 ist gegen Bienen- und Wespengift doppel-sensibilisiert. Sie wurde entsprechend mit Bienen- und Wespengift hyposensibilisiert. Sie erlitt 6 Monate sowie 5 ½ Jahre nach Beginn der SIT einen Feldstich. Die SIT gegen Bienengift dauerte 8 Jahre.

Nach dem ersten Stichereignis hatte die Patientin Schüttelfrost und hypotone Blutdruckwerte (90/60 mmHg). Beim zweiten Stichereignis klagte die Patientin über ein Engegefühl thorakal, Atemnot und Schwindel. Zudem wurden erneut Blutdruckwerte von 90/60 mmHg gemessen. Bei beiden Ereignissen applizierte sich die Patientin Adrenalin s.c..

Im Immunoblot für Bande 18 kDa ist erkennbar, dass zu jedem Zeitpunkt sIgG4 vorhanden ist. Das Verhältnis sIgE/sIgG4 ist sowohl nach 3 Monaten als auch nach 3 Jahren SIT kleiner 1. Damit ist anzunehmen, dass für dieses Einzel-Allergen ein immunologischer Schutz zum Zeitpunkt des ersten Stichereignisses bestand. Auch im Bereich der Bande 44 kDa ist zu jedem Zeitpunkt sIgG4 nachweisbar. Nach 3 Monaten ist das Verhältnis sIgE/sIgG4 jedoch noch kleiner 1, wird aber nach 3 Jahren größer 1. Da zum Zeitpunkt des Stichereignisses keine Messwerte vorliegen, kann nicht genau gesagt werden, wie das Verhältniss zum Zeitpunkt des ersten Stichereignisses und damit der immunologische Schutz war. Im Bereich der Bande 100 kDa konnten in den beobachteten Zeiträumen weder sIgE noch sIgG4 nachgewiesen werden. Verläufe der Immunglobuline siehe Abbildung 27 und 28.

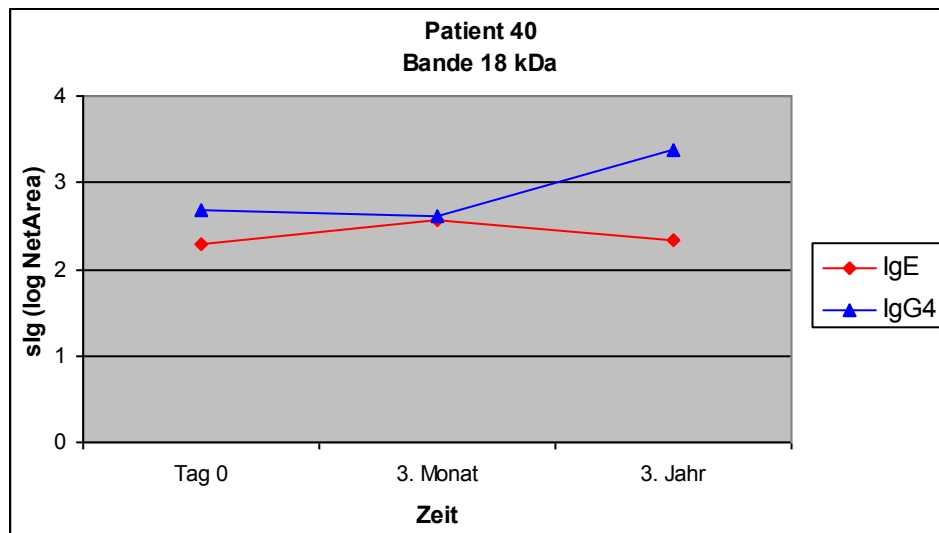


Abbildung 27 Verläufe sIgE und sIgG4 von Patient 40, Bande 18 kDa

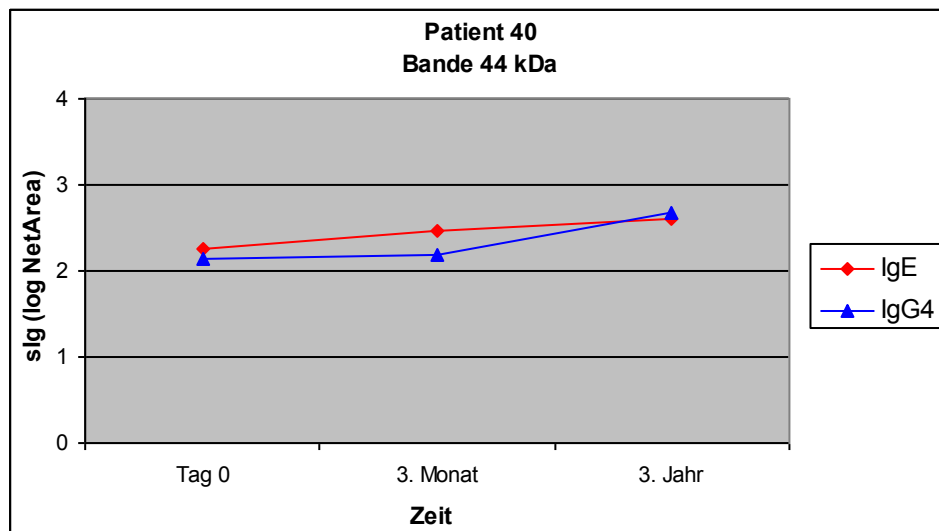


Abbildung 28 Verläufe sIgE und sIgG4 von Patient 40, Bande 44 kDa

5.4.2 Patienten mit Wespenstich

10 Patienten wurden im Verlauf oder nach Abschluss der SIT von einer Wespe gestochen. Die entsprechenden logarithmierten NetArea-Werte für sIgE siehe Tabelle 10, für sIgG4 siehe Tabelle 11.

				IgE Wespe								
				Bande 23 kDa			Bande 35 kDa			Bande 44 kDa		
Patient	Allergie	SIT	Reaktion	Tag 0	3. Monat	3. Jahr	Tag 0	3. Monat	3. Jahr	Tag 0	3. Monat	3. Jahr
16	W	W	NR	2.24	2.22	1.74	2.81	2.57	1.98	3.08	2.94	1.94
18	W	W	NR	1.55	2.09	2.12	1.66	2.08	2.01	1.88	2.30	2.22
20	W	W	NR	2.05	2.12	2.22	2.11	1.81	2.02	1.94	1.52	1.75
21	W	BW	NR	2.16	2.62	2.01	2.24	2.05	1.88	2.08	1.77	
23	W	W	NR	2.43	2.67	2.28	1.82	2.11	1.85	1.17	1.95	1.80
24	W	W	NR	2.78	2.46	2.22	2.01	2.10	2.00			
26	W	W	R	2.01	2.27	1.55	2.09	2.41	1.91	1.87	2.46	1.93
30	W	W	NR	2.27	2.48	2.26	2.06	2.47	2.27		2.63	1.92
34	W	W	NR	1.60	1.72	1.75	1.88	1.97	1.98			
40	BW	BW	NR	1.84	2.38	2.24	2.15	2.39	2.34	2.34	2.68	2.52

Tabelle 10 Logarithmierte NetArea-Werte IgE für die Banden 23 kDa, 35 kDa, 44 kDa für alle Wespengiftallergiker mit Feldstich (Wespe)

				IgG4 Wespe								
				Bande 23 kDa			Bande 35 kDa			Bande 44 kDa		
Patient	Allergie	SIT	Reaktion	Tag 0	3. Monat	3. Jahr	Tag 0	3. Monat	3. Jahr	Tag 0	3. Monat	3. Jahr
16	W	W	NR	2.25	2.85	3.20	1.78	2.12	2.56	1.62	1.55	2.63
18	W	W	NR	3.38	3.46	3.48	2.87	3.27	3.24	2.54	3.20	3.19
20	W	W	NR	1.94	2.93	3.18	1.91	1.85	2.45		1.44	2.09
21	W	BW	NR	2.06	2.94	3.48	2.50	3.09	3.22	1.74	2.06	3.40
23	W	W	NR	2.55	2.93	3.27	1.74	2.04	3.12		2.10	3.37
24	W	W	NR	1.93	2.00	2.43	1.93		1.97			
26	W	W	R	2.11	3.01	2.91	2.42	3.34	3.08	2.35	3.48	3.21
30	W	W	NR	2.42	3.21	3.11	1.75	2.73	2.87			2.02
34	W	W	NR		1.76	2.78	2.01	1.88	2.21			
40	BW	BW	NR	1.89	2.95	2.72	2.42	2.67	2.56	2.58	2.93	2.87

Tabelle 11 Logarithmierte NetArea-Werte IgG4 für die Banden 23 kDa, 35 kDa, 44 kDa für alle Wespengiftallergiker mit Feldstich (Wespe)

Von den insgesamt 10 Patienten tolerierten 9 Patienten einen bzw. mehrere Feldstiche problemlos. Eine Patientin erlitt nach Feldstich Reaktionen, die sie veranlasste, Notfallmedikamente zu gebrauchen.

Betrachtet man die Einzel-Verläufe der spezifischen Immunglobuline E und G4, so finden sich auch bei den Wespengiftallergikern keine Unterschiede zwischen den Patienten, welche einen Feldstich tolerierten und der Patientin, welche eine Reaktion nach Feldstich erlitten hatte.

In der Patientengruppe, welche einen Feldstich toleriert hatten, konnten in Bezug auf die Verläufe der sIgE-Werte sowohl steigende als auch fallende NetArea-Werte beobachtet werden. Insgesamt fanden sich hinsichtlich der Verläufe der sIgE im Verlauf der 3 Jahre keine signifikanten Veränderungen. Bei der Patientin mit Reaktion auf Feldstich konnte für die Bande 23 kDa und 35 kDa eine Abnahme, für die Bande 44 kDa eine Zunahme der

NetArea-Werte verzeichnet werden. Hinsichtlich der sIgG4-Werte kam es wiederum bei allen Patienten, sowohl denen mit toleriertem Feldstich als auch der Patientin, welche eine Reaktion nach Feldstich zeigte, zu einem Anstieg der Werte, bei den Patienten mit toleriertem Feldstich war dieser für alle Banden signifikant (23 kDa: Konfidenzintervall 1.13 – 0.53; $p < 0.001$; 35 kDa: Konfidenzintervall 0.94 – 0.24; $p = 0.005$; 44 kDa: Konfidenzintervall 1.31 – 0.29; $p = 0.009$). Da nur eine Patientin einen Feldstich nicht tolerierte, konnte für diese Patientin keine Signifikanzprüfung durchgeführt werden.

Bezüglich der unter 5.4 genannten Kriterien hinsichtlich des immunologischen Schutzes, wären alle 10 Patienten gemäß ihren immunologischen Parametern geschützt gewesen. Nur 9 Patienten zeigten auch klinisch keine Reaktion auf einen Feldstich.

Bei einer Patientin (Nr. 26) traten, wie bereits oben erwähnt, behandlungsbedürftige Beschwerden auf. Sie zeigte nach dem Stichereignis, welches 7 Jahre nach Beginn (4 Jahre nach Abschluss) der SIT stattfand, Symptome im Sinne von Schwindel, Ataxie, retrosternalen Schmerzen und Parästhesien, welche die Patientin veranlaßte, Notfallmedikamente inklusive subkutaner Adrenalinapplikation einzusetzen. Auf der Notfallstation wurde eine ausgeprägte Hyperventilation, jedoch keine Zeichen einer systemischen allergischen Reaktion beobachtet. Gemäß den Immunoblots, siehe auch Abbildung 29-31, wäre die Patientin gegen ein Stichereignis geschützt gewesen.

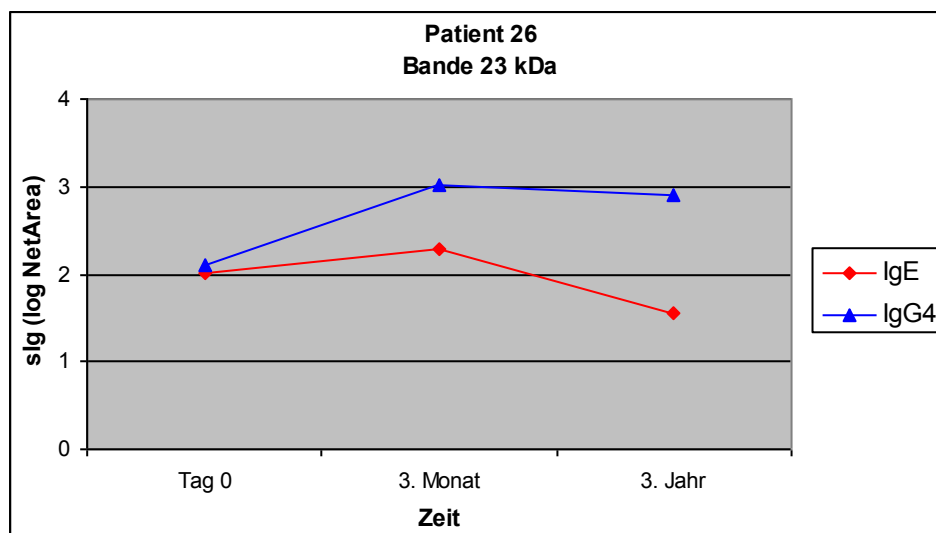


Abbildung 29 Verläufe sIgE und sIgG4 von Patientin 26, Bande 23 kDa

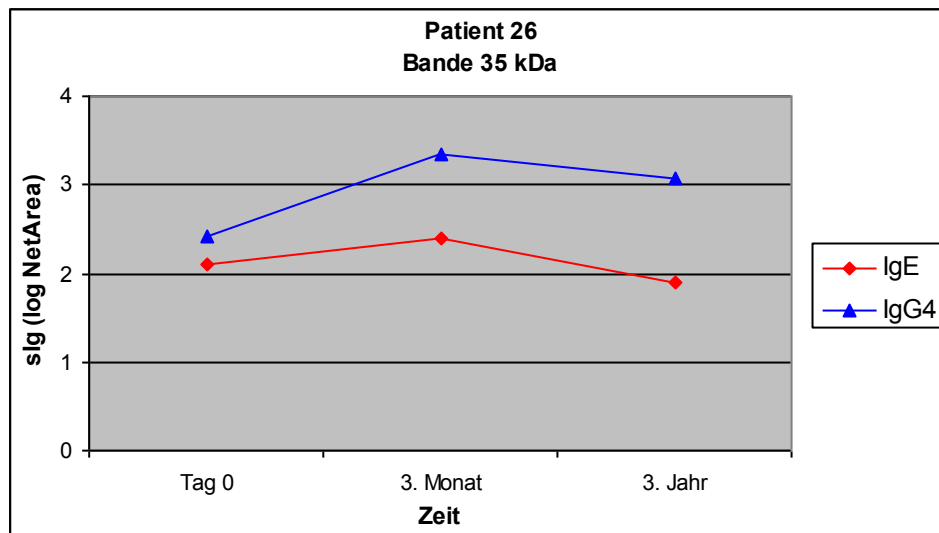


Abbildung 30 Verläufe slgE und slgG4 von Patientin 26, Bande 35 kDa

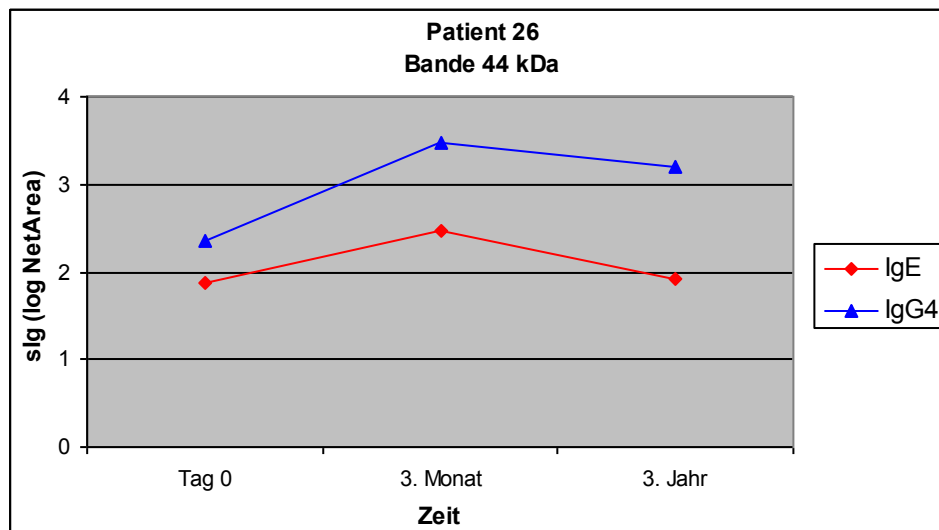


Abbildung 31 Verläufe slgE und slgG4 von Patientin 26, Bande 44 kDa

6 Diskussion

6.1 Das Verhalten von sIgE vor und während der spezifischen Immuntherapie

Als die SIT 1979 eingeführt wurde, wurde anfangs empfohlen, diese lebenslang oder wenigstens so lange fortzuführen, bis sowohl der Hauttest gegen Bienen- und Wespengift als auch die spezifischen IgE gegen Bienen- und Wespengift im Serum negativ werden. Schon relativ bald konnte gezeigt werden, dass selbst nach einer langdauernden SIT lediglich bei einer kleinen Anzahl von Patienten (ca. 25%) negative Testergebnisse zu verzeichnen waren.

Auch heute noch gilt das Absinken der sIgE-Titer während einer SIT als eine evidente Hypothese bezüglich der immunologischen Mechanismen, welche im Verlauf einer SIT stattfinden. Der derzeitige Konsens bezüglich des Verhaltens der sIgE-Titer während einer spezifischen Immuntherapie ist der, dass die SIT initial zu einem Anstieg der sIgE-Titer führt. Anschliessend kommt es mit der Zeit zu einem Abfall der sIgE-Titer, der individuell sehr stark variieren kann (Bilo et al. 2005, Akdis und Akdis. 2007), wobei von einer längerfristigen Therapie gewünscht wird, dass die sIgE-Titer wieder Level erreichen, wie vor Beginn der Therapie oder sogar niedrigerere (Senti et al. 2006).

Die eigenen Untersuchungen haben gezeigt, dass bei den Bienengiftallergikern im Verlauf der Hyposensibilisierungstherapie bis zum 3. Jahr eine signifikante Abnahme der NetArea-Werte des sIgE's zu verzeichnen war, dabei konnte sogar ein völliges Verschwinden von insgesamt 9 IgE-Banden (bei 2 Patienten bei 18 kDa, bei 4 Patienten bei 44 kDa, bei 3 Patienten bei 100 kDa) beobachtet werden. Damit stehen unsere Ergebnisse in guter Übereinstimmung zu der Arbeit von Pereira et al. (Pereira et al. 2005), welche in einer Studie mit 17 Patienten ebenfalls einen signifikanten Abfall des sIgE's bzw. ein völliges Verschwinden von insgesamt 9 IgE-Banden nach 3 Jahren fanden.

Lerch und Müller untersuchten in einer Studie mit 200 Patienten die spezifischen Immunglobuline gegen Bienen- und Wespengift mittels Immuno-CAP (Lerch und Müller 1998). Auch sie konnten eine signifikante Abnahme des sIgE's während der SIT nachweisen. Hipler und Kollegen fanden ebenfalls einen signifikanten Abfall der sIgE-Titer während der Hyposensibilisierungsbehandlung (Hipler et al. 2001).

Bei den Wespengiftallergikern konnte in der vorliegenden Studie während der ersten 3 Monate der SIT ein signifikanter Anstieg der NetArea-Werte des IgE gegen Phospholipase A1 und Hyaluronidase gemessen werden. Damit fanden wir ähnliche Ergebnisse wie Freising und Jappe, welche ebenfalls Immunoblotuntersuchungen bei Insektengiftallergikern durchführten (Freising und Jappe 2006). Auch sie konnten unmittelbar nach Beginn der SIT

einen deutlichen Anstieg des sIgE's messen. Die Beobachtung, dass die sIgE-Konzentration kurz nach Therapiebeginn vorübergehend ansteigt, wurde auch von anderen Arbeitsgruppen bereits in Studien mit RAST-Untersuchungen gemacht (Kemeny et al 1989, Reisman und De Masi 1989, Golden 2001).

Jeannin et al. (Jeannin et al. 1998) konnten in einer Studie zeigen, dass IL-10 für die IgE-Synthese auf naive B-Zellen eine inhibierende, auf B-Zellen, die bereits auf IgE umgeschaltet haben, jedoch eine fördernde Wirkung ausübt. Überträgt man dies auf die Situation während einer SIT, so könnte der initiale Anstieg des IgE's nach Beginn der SIT von den bereits gewitchten B-Zell-Populationen stammen, deren Produktion durch IL-10 weiter gefördert wird. Dagegen hat IL-10 einen negativen Effekt auf den IgE-Klassenwechsel ungeschwicherter Zellen, so dass langfristig das IgE abfällt.

Zwischen dem 3. Monat und 3. Jahr kam es bei allen betrachteten Allergenen der Wespengiftallergiker zu einem Abfall der NetArea-Werte des IgE's, insgesamt betrachtet jedoch konnte nur für das Antigen 5 ein signifikanter Abfall nach 3 Jahren im Vergleich zum Ausgangswert vor SIT gefunden werden. Auch Senti et al. (Senti et al. 2006) machten bei Wespengiftallergikern die Beobachtung, dass die SIT keinen signifikanten Effekt auf den Verlauf des sIgE's hat.

Bei genauerer Betrachtung der Verläufe des sIgE's fanden sich sowohl bei der Phospholipase A1 als auch bei der Hyaluronidase 2 Antwortmuster: bei 14 Patienten (Phospholipase A1) bzw. 7 Patienten (Hyaluronidase) kam es zu einer signifikanten Abnahme der NetArea-Werte der IgE. Bei den restlichen 12 Patienten (Phospholipase A1) bzw. 10 Patienten (Hyaluronidase) kam es zu einem Anstieg, gemessen vom Ausgangswert über die 3 Jahre SIT, welcher ebenfalls signifikant war. Zu erwähnen dabei ist, dass 5 Patienten, welche über 3 Jahre SIT einen signifikanten Anstieg des sIgE's gegen Phospholipase und Hyaluronidase hatten, einen Feldstich problemlos toleriert hatten.

Ähnliche Ergebnisse erhielten Birkner et al. in einer Immunoblotstudie an Patienten mit Birkenpollenallergie. Sie beobachteten bei einigen Patienten, welche klinisch eine Besserung der Symptomatik angaben, im Immunoblot einen Anstieg der sIgE-Banden (Birkner et al. 1990).

Hingegen wurden von einigen Autoren über systemische Reaktionen von Patienten berichtet, bei denen nach 3 und mehr Jahren SIT keine sIgE's im RAST mehr nachweisbar waren (Müller et al. 1991).

Die o.g. Beobachtungen lassen darauf schliessen, dass der Verlauf des sIgE's nicht geeignet ist, Aussagen über das klinische Ansprechen sowie das Outcome bezüglich eines Feldstiches nach einer SIT zu machen. Obwohl Golden et al. (Golden et al. 1996) in einer Studie über das Outcome 5 Jahre nach Beendigung einer SIT zeigen konnten, dass

Patienten, welche nach Hymenopterenstich eine systemische Reaktion erlitten, höhere sIgE-Level hatten als Patienten ohne systemische Reaktion, haben gemäß den Empfehlungen der Europäischen Akademie für Allergologie und klinische Immunologie (EAACI) die Level des sIgE's per se keinen Vorhersagewert bezüglich des Outcomes eines Stiches nach Abschluss der SIT (Bonifazi et al. 2005). Auch Lerch und Müller (Lerch und Müller 1998) fanden trotz signifikanter Abnahme der sIgE-Werte während der SIT keine Unterschiede hinsichtlich der Verläufe der sIgE-Werte zwischen den Patienten, welche einen Feldstich in der Folge tolerierten und denen, welche nach Feldstich eine allergische Reaktion erlitten. Somit kamen auch sie zu dem Schluss, dass die sIgE-Werte keinen prognostischen Wert bezüglich der Aussagekraft über einen Langzeitschutz nach SIT haben.

Ebenso beobachteten Pereira und Mitarbeiter in ihren Immunoblotstudien während einer erfolgreichen SIT einen signifikanten Abfall des sIgE's (Pereira et al 2005). Aber auch sie äusserten, dass der Verlauf des sIgE's allein keine schlüssigen Aussagen bezüglich klinischer Relevanz bzw. Outcome einer SIT zulässt. Sie postulierten, dass die immunologischen Veränderungen, welche durch die SIT ausgelöst werden, besser mit Hilfe des Verhältnisses sIgE/sIgG4 wiedergegeben werden können.

Auch unsere Resultate über den Verlauf der NetArea-Werte des sIgE's gegen Bienen- und Wespengift über 3 Jahre lassen keine sicheren Rückschlüsse bezüglich der Aussage über das Outcome eines Feldstiches zu. Zum einen ist die Anzahl derer Patienten, welche einen Feldstich nicht tolerierten, zu klein, um konkrete Aussagen machen zu können, welches Ausmaß an Änderungen im Verlauf der sIgE-Level während oder nach SIT nötig sind, um zwischen einer erfolgreichen oder nicht-erfolgreichen SIT zu unterscheiden. Zum anderen unterscheiden sich die Verläufe der NetArea-Werte des sIgE's von den Patienten, welche einen Feldstich tolerierten nicht wesentlich von denen, welche eine Reaktion auf einen Feldstich hatten, die sie veranlaßte, Notfallmedikamente einzunehmen und einen Arzt aufzusuchen. Zudem müssen die Aussagen bezüglich eines Feldstiches mit Vorsicht betrachtet werden. Im Vergleich zu einer Stichprovokation sind die Aussagen eines Feldstiches weniger verlässlich. Die Gründe hierfür sind, dass eine Identifikation des gestochenen Insektes nicht immer zweifelsfrei möglich ist, die applizierte Giftmenge variieren kann und eine objektive Bewertung der Symptome durch einen Arzt meistens fehlt (Müller et al. 1991, Ruëff et al 1996, Lang und Hawranek 2006).

6.2 Das Verhalten von sIgG4 vor und während der spezifischen Immuntherapie

Die Tatsache, dass im Serum nichtallergischer Imker sIgG4 nachweisbar ist (Jeep et al. 2001) und dass spezifisches IgG und besonders spezifisches IgG4 während einer SIT ansteigt, führt zur Annahme, dass diese Antikörper vor einer sofortigen allergischen Reaktion

schützen. Urbanek et al. (Urbanek et al. 1986) wiesen darauf hin, dass eine Langzeitimmunität gegen Insektenstiche mit einem hohen spezifischen IgG4-Spiegel einherginge und daher der Erfolg einer Immuntherapie an der Messung dieser Antikörper festzustellen sein soll. Einarsson konnte in einer Immunoblotstudie ebenfalls einen signifikanten Anstieg der spezifischen IgG4-Bande während einer zweijährigen Immuntherapie von Wespengiftallergikern nachweisen (Einarsson et al. 1989). Pereira et al. (Pereira et al. 2005) konnten in einer Studie mit 17 Hymenopterengiftallergikern zeigen, dass es im Verlauf einer erfolgreichen SIT zu einem Anstieg des sIgG4's, bei einzelnen Patienten sogar zu einem denovo Auftreten von einzelnen IgG4-Banden kam.

Auch in den vorliegenden Untersuchungen konnte ein ähnliches Verhalten der sIgG4-Banden wie in den o.g. Studien gezeigt werden. Innerhalb der ersten 3 Monate der SIT war ein signifikanter Anstieg der sIgG4-NetArea-Werte im Immunoblot zu verzeichnen, dies sowohl für die Bienen- als auch für die Wespengiftallergiker. Vom 3. Monat bis zum 3. Jahr der SIT gab es keine signifikanten Änderungen der sIgG4-NetArea-Werte. Insgesamt war der Anstieg der sIgG4-NetArea-Werte von Beginn der SIT bis zum 3. Jahr jedoch signifikant.

Dabei gab es bezüglich der Verläufe der sIgG4-NetArea-Werte keinerlei Unterschiede zwischen den Patienten, welche im Verlauf der SIT oder nach Abschluss der Therapie einen Feldstich erlitten und diesen tolerierten oder nicht.

In der Literatur gibt es noch keinen einheitlichen Konsens über die Frage, ob anhand der Verläufe des sIgG4's eine prognostische Aussage hinsichtlich des klinischen Ansprechens einer SIT bzw. des Outcome eines Feldstiches gemacht werden kann oder nicht.

1987 veröffentlichten Gentlesk et al. (Gentlesk et al. 1987) eine Studie, in der sie den Langzeiteffekt einer SIT anhand der Bestimmung des spezifischen IgG4's mittels RAST untersuchten. Sie machten die Beobachtungen, dass die sIgG4-Level im ersten Jahr der SIT – häufig sehr stark – anstiegen, dann im zweiten und dritten Jahr einen Plateauwert erreichten und anschließend wieder abnahmen. Da trotz niedriger oder sogar vernachlässigbar geringer Level an sIgG4 nach mehr als 3 Jahren SIT Patienten einen Feldstich tolerierten, gingen sie davon aus, dass für einen längerfristigen Schutz andere Mechanismen verantwortlich seien, so z.B. zellvermittelte Reaktionen.

Golden et al. (Golden et al. 1992) konnten 1992 in einer Studie nachweisen, dass systemische Reaktionen bei Patienten mit höheren sIgG-Leveln signifikant weniger auftraten als bei Patienten mit niedrigen sIgG-Leveln. Dies konnte jedoch nur für Patienten nachgewiesen werden, welche eine SIT von weniger als 4 Jahren Dauer erhalten hatten. Hatten Patienten mehr als 4 Jahre eine SIT erhalten, gab es keine signifikanten Unterschiede im Auftreten einer systemischen Reaktion zwischen den Patienten mit niedrigen und denen mit hohen sIgG-Leveln. Die sIgG-Level hatten, gemäß der Resultate

dieser Studie, somit bei einer Dauer der SIT von 4 Jahren oder mehr keinen Vorhersagewert mehr bezüglich Outcome eines Stichereignisses. Golden et al. (Golden et al 1992) postulierten, dass nach 5 Jahren SIT diese abgebrochen werden kann und die Patienten, ungeachtet ihrer sIgG-Level, geschützt sein sollten. Wie auch Gentlesk et al. (Gentlesk et al. 1987) gingen sie davon aus, dass nach 4 Jahren der Schutz durch andere Mechanismen als sIgG gewährleistet wird.

Dagegen demonstrierte Müller et al. (Müller et al. 1989), dass einzelne spezifische IgG4-Level sowohl in einer Frühphase der SIT (innerhalb von 2 bis 12 Monaten nach Beginn der SIT) als auch in einer Spätphase der SIT (innerhalb von 28 bis 108 Monaten nach Beginn der SIT) keinen Vorhersagewert bezüglich dem Auftreten einer allergischen Reaktion nach Insektenstich haben.

Auch in der Studie von Wilson et al. (Wilson et al. 1994) sowie in der von Lerch und Müller (Lerch und Müller 1998) konnte gezeigt werden, dass anhand der absoluten Level von sIgG-Subklassen keine verlässlichen Aussagen zur klinischen Ansprechbarkeit einer SIT bzw. dem Outcome eines Feldstiches nach SIT gemacht werden können.

Obwohl eine erfolgreiche SIT im Allgemeinen mit einem Anstieg des sIgG4's assoziiert zu sein scheint, konnte in der Mehrzahl der Studien keine eindeutige Korrelation zwischen sIgG4-Titern und der klinischen Wirksamkeit der SIT gefunden werden. Das lässt darauf schliessen, dass die quantitativen Messungen der sIgG4 keinen geeigneten Vorhersagewert für den Erfolg einer SIT zu haben scheinen. Einen alternativen Denkansatz lieferten Wachholz und Durham in einem 2004 veröffentlichten Review. Sie gehen davon aus, dass vor allem „funktionelle“ Veränderungen der sIgG4-Aktivität, d.h. Änderungen in der Spezifität und der Affinität der IgG4-Antikörper, Effekte auf die Memory B-Zellen und antigen-präsentierenden Zellen mit einer erfolgreichen SIT assoziiert sind. Änderungen in der Spezifität von spezifischen IgG, induziert durch eine SIT, wurden erstmals von Michils et al. in einer Studie mit Wespengiftallergikern beschrieben (Michels et al 1997). Sie machten die Beobachtung, dass Serum von Wespengiftallergikern (zum Zeitpunkt vor und in den ersten Tagen nach Beginn einer SIT) die Allergenbindung von an Biotin gebundenem IgG von Wespengiftallergikern (ebenfalls vor und in den ersten Tagen nach Beginn einer SIT) in grösserem Masse inhibiert, als Serum von Patienten, welche bereits seit mindestens 2 Jahren mittels SIT behandelt wurden, trotz höherer sIgG-Titer bei Letzteren. Dies deutet darauf hin, dass IgG-Antikörper, welche durch SIT induziert werden, nicht gegen die selben Epitope konkurrieren, sondern eher verschiedene Epitop-Spezifitäten entwickeln.

Bisher nur in Studien mit Birken- und Graspollenallergikern wurde der Einfluss von sIgG4 auf die IgE-abhängige Antigenpräsentation untersucht (van Neerven et al. 1999, Nouri-Aria KT et al. 2004). Es konnte nachgewiesen werden, dass sIgG4 die Bildung von Allergen-IgE-

Komplexen hemmt. Diese Komplexe sind zur Bindung an den FcεRII-Rezeptor erforderlich, welcher von antigenpräsentierenden Zellen (B-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten) exprimiert wird. Infolgedessen wird die Antigenpräsentation gehemmt, was wiederum zu einer abnehmenden T-Zell-Proliferation und verminderten Produktion von Zytokinen führt.

Diese qualitativen Veränderungen der sIgG4-Aktivität könnten als ein bedeutender Mechanismus, welcher der klinischen Wirksamkeit der SIT zugrunde liegt, gesehen werden. Gemäß der Studienresultate von Wachholz und Durham sind also die Erfolge einer SIT nicht durch die steigenden IgG4-Level per se erklärbar, sondern sind vielmehr das Resultat von Veränderungen hinsichtlich der Spezifität und Affinität des sIgG4's.

Von einigen Autoren (Bohle 2008) wird sogar die Frage aufgeworfen, ob die steigenden IgG4-Werte während der SIT wirklich von klinischer Relevanz sind oder es sich dabei nicht nur um ein Epiphänomen handelt. Wie bereits vorherig erwähnt, vermuteten 1987 schon Gentlesk et al. (Gentlesk et al. 1987) sowie 1992 Golden et al. (Golden et al. 1992), dass für einen längerfristigen Schutz andere Mechanismen als sIgG verantwortlich sind. Gemäß neuerer Studien gibt es zunehmende Hinweise, dass die IL-10- und/oder TGF-β-sezernierenden Treg-Zellen eine Schlüsselrolle während einer erfolgreichen SIT spielen (Akdis und Akdis 2007, Bohle 2008). Wie bereits in Abschnitt 1.6.2 dargelegt, beeinflussen die Treg-Zellen die allergenspezifische Immunantwort auf verschiedenen Wegen. Neben der Induktion von sIgG4 und Supprimierung der sIgE-Produktion haben die Treg-Zellen, bzw. die von ihnen produzierten Zytokine IL-10 und TGF-β, zudem supprimierende Effekte auf die T-Zell-Aktivierung (Akdis und Akdis 2007).

Ob möglicherweise die durch die Treg-Zellen induzierte periphere T-Zell-Toleranz, gemessen an verminderter Proliferation und Zytokinsekretion einen vordergründigeren Effekt an der Wirksamkeit einer SIT hat als die „blockierenden Antikörper“, und damit die sIgG4 nur als Epiphänomen zu betrachten sind, bleibt vorerst unbeantwortet.

6.3 Verhältnis IgE/IgG4 vor und nach 3 Jahren spezifischer Immuntherapie

Gemäß publizierter Studien von Ollert und Jeep (Ollert und Ring 1999, Jeep et al. 1996) gelten die Patienten als geschützt, welche zum Stichzeitpunkt zumindest gegen all jene Allergenbanden eine sIgG4-Reaktivität aufweisen, die vor Therapie IgE-positiv waren. Nicht geschützte Patienten weisen zum Stichzeitpunkt einen isolierten Mangel an sIgG4-Reaktivität bei einer beliebigen Allergenbande auf, die vor Therapie sIgE-positiv war. Zudem gehen Jeep et al. (Jeep et al. 1996) zusätzlich davon aus, dass ein Quotient von sIgE/sIgG4 unter 1 einen Schutz wahrscheinlich macht.

Wir untersuchten bei allen Patienten das Verhältnis sIgE/sIgG4 zu Beginn der SIT und nach 3 Jahren. Bei der Mehrzahl der Patienten konnte im Verlauf der SIT eine Abnahme dieses Verhältnisses beobachtet werden. Lediglich bei 5 von 41 Patienten konnte eine Zunahme in jeweils einer Einzel-Allergenbande nachgewiesen werden (bei 3 Patienten bei Bande 35 kDa (Phospholipase A1) und bei 2 Patienten bei Bande 44 kDa (Hyaluronidase)). Die Verläufe der Verhältnisse sIgE/sIgG4 über die 3 Jahre zeigte keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten, welche einen Feldstich problemlos tolerierten und denen, welche eine allergische Reaktion nach Feldstich hatten.

Bei eingehender Betrachtung der Patienten mit Stichereignis wären 17 von insgesamt 20 Patienten gemäß ihren immunologischen Parametern geschützt. Von diesen 17 Patienten tolerierten 15 Patienten einen Feldstich ohne Probleme. 2 Patienten wären gemäß ihren Immunoblotuntersuchungen geschützt gewesen, zeigten jedoch Reaktionen, welche sie veranlasste, Notfallmedikamente zu benutzen. Beide Patienten suchten die Notfallstation auf, es konnten jedoch keine objektiven Anzeichen einer systemischen Reaktionen nachgewiesen werden. Wie schon vorherig erwähnt, sollten die Angaben bezüglich einer Reaktion nach Feldstich mit Vorsicht bewertet werden. Ein erhebliches Problem hierbei stellt die subjektive Interpretation der Reaktionen dar. Somit wäre es auch denkbar, dass es sich bei den beiden o.g. Patienten, welche immunologisch eigentlich geschützt sein sollten, nicht um allergische Reaktionen im eigentlich Sinne handelte, sondern evtl. „bloß“ um Reaktionen, welche am ehesten „psychogener“ Natur gewesen sind.

2 Patienten, welche anhand des Immunoblotmusters als „nicht geschützt“ prognostiziert wurden, tolerierten einen Feldstich problemlos. Eine mögliche Erklärung für diese „Fehleinstufung“ könnte darin zu sehen sein, dass die Menge an Gift, welches das Insekt bei einem Stich abgibt, beträchtlich variieren kann, abhängig vom Alter des Insektes, der Jahreszeit, dem Fassungsvermögen des Giftsackes und dem zeitlichen Abstand zum letzten Stich. Bei Wespen, welche zum Teil mehrmals pro Tag stechen und sogar Gift in die Luft sprühen (Ruëff et al. 1996), wenn sie sich bedroht fühlen, ist diese Tatsache besonders bedeutsam. Zum anderen können einige Patienten auch erst nach dem 2., 3. oder noch späteren Stich reagieren, während der erste Stich nach SIT gut toleriert wurde (Ollert und Ring 1999).

Eine weitere Frage, welche bisher noch nicht eindeutig geklärt werden konnte, ist die klinische Bedeutung der Minorallergene. So war bei den 2 Patienten, welche eigentlich gemäß den Immunoblotuntersuchungen nicht geschützt waren, einen Feldstich jedoch ohne Probleme tolerierten, sIgE im Bereich der Allergenbande 100 kDa zu Beginn der SIT bis zum 3. Monat vorhanden, dann war es nicht mehr nachweisbar. Obwohl in den Allergenlösungen, welche für die SIT verwendet wurden, auch Allergen C (Allergen von 100 kDa) vorhanden ist,

konnte zu keinem Zeitpunkt sIgG4 gegen Allergen C bei diesen beiden Patienten nachgewiesen werden. Somit stellt sich die Frage, ob sIgE gegen dieses Minorallergen bei diesen beiden Patienten überhaupt eine klinisch bedeutsame Rolle bei der Auslösung allergischer Reaktionen spielt.

Ein Patient, welcher aufgrund der Immunoblotuntersuchungen „nicht geschützt“ sein sollte, zeigte auch nach einem Feldstich systemische allergische Reaktionen.

Trotz fehlender Signifikanz zwischen den Verläufen sIgE/sIgG4 der Patienten mit toleriertem Feldstich und nicht toleriertem Feldstich und zu dem sehr kleiner Fallzahlen v.a. derer Patienten mit nicht toleriertem Feldstich, scheint somit ein positiver Immunoblot (d.h. Schutzwirkung gemäss Immunoblot) insgesamt auf eine Schutzwirkung der SIT hinzudeuten. Damit werden unsere Ergebnisse im wesentlichen von der Arbeit von Ollert und Ring (Ollert und Ring 1999) unterstützt. Allerdings müssen die Stichereignisse kritisch betrachtet werden. Da in 2 Fällen keine eigentliche systemische Reaktion objektiviert werden konnte, kann nicht mit Sicherheit davon ausgegangen werden, dass diese Patienten auch tatsächlich eine allergische Reaktion hatten und somit eigentlich – gemäß ihren immunologischen Parametern – geschützt wären. Dies könnte auch eine mögliche Erklärung dafür sein, dass Hipler et al. (Hipler et al. 2001) in ihren Immunoblotstudien bei Insektengiftallergikern lediglich eine Sensitivität des Western Blots hinsichtlich prognostischer Bedeutung von 66% fanden. Auch Freising und Jappe (Freising und Jappe 2006) untersuchten in einer Studie mit 47 Hymenopterenallergikern die Verläufe des sIgE's und sIgG4's während der SIT mit Hilfe des Western-Blots. Bezüglich der prognostischen Wertigkeit der Western Blots ergab sich anhand Ihrer Untersuchungen eine Sensitivität von 77%.

Jeep et al. stellten 1996 in einer Immunoblotstudie die Hypothese auf, dass ein Schutz wahrscheinlich ist, wenn das Verhältnis sIgE/sIgG4 kleiner 1 ist. Diese Hypothese war hoch signifikant (Jeep et al. 1996). Es fanden sich zwar auch in unseren Untersuchungen nach Abschluss der SIT bei der Mehrzahl der Patienten Verhältnisse kleiner 1, aber bereits vor SIT konnten wir bei 22 von 41 Patienten (11 von diesen Patienten tolerierten einen Feldstich ohne Probleme) im Bereich einzelner oder mehrerer Banden Verhältnisse kleiner 1 messen. Dies könnte wiederum auf die bereits in Abschnitt 5.2. erwähnten Resultate der Studie von Wachholz und Durham (Wachholz und Durham 2004) hindeuten, dass die qualitativen Veränderungen des sIgG4's, welche durch eine SIT induziert werden, eine wesentlichere Rolle am Erfolg einer SIT haben, als die quantitativen.

Tatsache ist, dass im Moment kein verlässlicher Parameter existiert, um die klinische Reaktionslage des Patienten zu prognostizieren. Um nicht geschützte Patienten zu identifizieren, gibt es immer noch keine andere Möglichkeit als die Stichprovokation mit einem lebenden Insekt (Ruëff et al. 1996), bzw. die Erfassung der Reaktion auf einen

Feldstich, wobei Letzteres, wie bereits vorherig erwähnt, im Vergleich zur Stichprovokation unzuverlässiger ist (Ruëff et al. 1996, Lang und Hawranek 2006). Gemäss Positionspaper der EAACI (Ruëff et al. 1996) sowie einer Studie von Lang und Hawranek (Lang und Hawranek 2006) ist jedoch auch die Stichprovokation kein wirklich verlässlicher Parameter, um die individuelle Reaktionslage des Patienten in Hinblick auf zukünftige Stiche zu beurteilen. Es kann sein, dass nach tolerierter Stichprovokation bei einem erneuten Stichereignis eine allergische Reaktion auftreten kann. Es wurde sogar über Fälle berichtet, bei denen schwere allergische Reaktionen erst nach mehreren tolerierten Stichen beobachtet wurden. Auch kann es möglich sein, dass nach einer Stichprovokation systemische allergische Reaktionen auftreten und ein anschliessender Insektenstich problemlos toleriert wird. Folglich kann der individuelle Schutz, welcher durch eine SIT erworben wird, durch eine Stichprovokation nicht bewiesen werden. Alles in allem ist die Stichprovokation aber ein nützliches Hilfsmittel, um den zum Stichzeitpunkt bestehenden Schutz zu evaluieren, jedoch vorausgesetzt, dass das Outcome der Stichprovokation kritisch bewertet wird.

Dies zeigt die Notwendigkeit, nach einem zuverlässigeren Parameter zur Beurteilung der klinischen Reaktionslage des Patienten hinsichtlich des Outcomes eines zukünftigen Stichereignisses zu suchen.

Hierfür lieferten Konno et al. in einer Studie einen vielversprechenden Ansatz (Konno et al. 2005). Sie führten cDNA Microarrays und Clusteranalysen an peripheren mononukleären Zellen bei Hymenopterengiftallergikern durch. Sie stellten fest, dass eine erfolgreich abgeschlossene SIT mit einer signifikant vermehrten Expression von Osteopontin assoziiert war. Dies liess darauf schliessen, dass Osteopontin eine potenzielle Rolle als Biomarker einer erfolgreichen SIT spielen muss. Um diese Hypothese zu bestätigen, wurden die Osteopontin-Serum Levels von unbehandelten Hymenopterengiftallergikern sowie von Hymenopterengift-allergikern, welche eine 5-6-jährige SIT durchgeführt und zum Untersuchungszeitpunkt bereits seit mindestens 3 Jahren abgeschlossen hatten und folgend einen Insektenstich problemlos tolerierten, analysiert. Dabei fanden sich signifikant höhere Osteopontin-Levels in der Gruppe der Patienten mit abgeschlossener SIT. Aufgrund der Tatsache, dass bei verschiedenen Th1-assoziierten Erkrankungen wie Rheumatoider Arthritis und Multipler Sklerose erhöhte Osteopontin-Level beobachtet wurden, wird postuliert, dass Osteopontin ein Th1-Zytokin ist und an Th1-assoziierten Immunreaktionen beteiligt ist. (Ashkar et al. 2000, Chabas et al. 2001, Ohsima et al. 2002). Die Tatsache, dass eine erfolgreiche SIT mit einer Verschiebung des Th1-Th2-Gleichgewichtes der Immunantwort in Richtung Th1 assoziiert ist, lässt darauf spekulieren, dass die Th1-induzierende Aktivität von Osteopontin möglicherweise eine Rolle an der Modulierung der Immunantwort spielt.

Eine weitere vielversprechende Alternative, um die klinische Reaktionslage eines Patienten verlässlich zu beurteilen, stellten Senti et al. in einer 2006 publizierten Studie vor (Senti et al. 2006). Ausgehend von der Tatsache, dass sIgG und -Subklassen entscheidend am Schutz gegen Insektengiftallergien beteiligt sind, postulierten sie, dass das Serum von Insektengiftallergikern während oder nach SIT entsprechend in der Lage sein sollte, das Allergen zu neutralisieren und eine allergische Reaktion zu verhindern. Um diese Hypothese zu bestätigen, entwickelten sie einen in vivo Neutralisations-Hauttest. Dafür wurde den Patienten ihr eigenes Serum in entsprechenden Verdünnungsstufen in den Unterarm injiziert. Neben die entsprechenden Injektionsstellen wurde Wespengift in einer Dosis appliziert, bei welcher in einem vorher durchgeführten Hauttest eine positive Hautreaktion hervorgerufen werden konnte. Die Reaktion wurde anschliessend anhand der Grösse der Quaddel und des Erythems bewertet. Die Resultate dieses Allergen-Neutralisations-Hauttestes zeigten, dass das Patientenserum im Verlauf einer SIT die Fähigkeit erlangt, Hautreaktionen gegen Wespengiftextrakte zu neutralisieren. Dabei bestand sowohl eine positive Korrelation zur Dauer der SIT wie auch zur Konzentration des sIgG's und sIgG4's. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass eine gute Korrelation zwischen Neutralisations-Hauttest und Schutz gegen eine Wespengiftallergie besteht. Damit könnte der Neutralisationstest ein vielversprechendes Hilfsmittel in der Allergiediagnostik und zur Monitorisierung einer SIT werden.

7 Schlussfolgerungen

1935 konnte von Cooke et al. (Cooke et al. 1935) erstmals demonstriert werden, dass „durch eine Immuntherapie eine Art inhibierende Substanz produziert wird, welche das Allergen davor schützen, mit den sensibilisierten Zellen zu reagieren“. Später bezeichnete man diese Substanzen als allergenspezifische IgG-Antikörper oder auch blockierende Antikörper, welche die Kaskade der allergischen Reaktion, ausgelöst durch die Allergenerkennung durch IgE-Antikörper, antagonisieren. In den letzten Jahren gab es jedoch kontroverse Diskussionen um die protektive Rolle der IgG-Antikörper bei allergischen Erkrankungen. In einem 2003 erschienen Review (Flicker und Valenta 2003) wird das Konzept der blockierenden Antikörper jedoch wiederbelebt. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Induktion von blockierenden Antikörpern einen der Hauptmechanismen im Verlauf einer SIT darstellt.

Trotz Fortschritte, die Mechanismen einer erfolgreichen SIT zu verstehen, gibt es aktuell noch immer keinen in vitro Parameter, welcher verlässlich Auskunft geben kann, ob eine SIT erfolgreich war oder nicht, d.h. ob ein Patient im Falle eines erneuten Hymenopterenstiches eine systemische Reaktion haben wird oder nicht. Zur Zeit wird noch immer die potentiell lebensgefährliche Stichprovokation empfohlen. Die Aussage dieses Testes muss jedoch mit Vorsicht bewertet werden, da einige Patienten auch erst nach dem 2., 3. oder noch späteren Stich reagieren können, während der erste Stich nach SIT gut toleriert wurde. Ebenfalls kann nach Stichprovokation eine systemische allergische Reaktion auftreten, während folgende Stiche problemlos toleriert werden.

Ziel dieser Arbeit war es, Immunoblot-Veränderungen von sIgE und sIgG4 von Bienen- und Wespengiftallergikern vor und während einer spezifischen Immunotherapie zu analysieren und Aussagen über einen möglichen Schutz vor systemischen allergischen Reaktionen bei erneutem Insektenstich zu machen.

Es wurde im Verlauf der 3 beobachteten Jahre eine signifikante Abnahme der sIgE-NetArea-Werte gegen Phospholipase A2 und Hyaluronidase bei den Bienengiftallergikern gefunden, während bei den Wespengiftallergikern keine signifikanten Änderungen beobachtet werden konnten. Bezüglich der sIgG4-NetArea-Werte fand sich sowohl bei den Bienen- als auch bei den Wespengiftallergikern gegen alle Allergene eine signifikante Zunahme. Zudem konnten wir eine Abnahme des Verhältnisses sIgE/sIgG4 im Verlauf von 3 Jahren SIT nachweisen. Es fanden sich jedoch insgesamt keine signifikanten Unterschiede zwischen den Patienten, welche einen Feldstich tolerierten und denen, welche diesen nicht tolerierten.

Gemäss den vorliegenden Untersuchungen lässt sich sowohl anhand der Verläufe der sIgE als auch der sIgG4 keine Aussage über das klinische Ansprechen bzw. das Outcome bzgl.

eines Feldstiches nach einer SIT machen. Dies deckt sich mit den Untersuchungsergebnissen anderer Autoren (Müller et al. 1989, Lerch und Müller 1998, Wachholz und Durham 2004, Pereira et al. 2005), welche ebenfalls keine Korrelation zwischen den Verläufen der Immunglobuline und der klinischen Wirksamkeit einer SIT fanden.

Aufgrund des zudem kleinen Patientenkollektives und v.a. aufgrund der kleinen Fallzahlen der Patienten, welche eine allergische Reaktion nach Feldstich erlitten hatten, ist auch eine allgemeingültige Aussage über den prognostischen Wert des Verhältnisses slgE/slgG4 im Hinblick auf den Schutz vor erneutem Stich nicht zu treffen.

Obwohl wir ähnliche Ergebnisse wie Ollert und Ring (Ollert und Ring 1999) sowie Pereira und Mitarbeiter (Pereira et al. 2005) in ihren Immunoblotstudien fanden, können wir die Euphorie im Hinblick auf die prognostische Aussagekraft des Verhältnisses IgE/IgG4 nicht mehr ganz teilen. In neueren Studien (Wachholz und Durham 2004) konnte nachgewiesen werden, dass durch eine SIT neben den quantitativen Veränderungen, also dem Anstieg der slgG -Antikörper-Titer auch qualitative Veränderungen der slgG ausgelöst werden. So fanden sich in diesen Untersuchungen zum einen Änderungen in der Antikörper-Spezifität, zum anderen Einflüsse auf die IgE -vermittelte Antigenpräsentation. Es scheint damit in Zukunft eher das Augenmerk auf die Messung dieser „funktionellen“ Veränderungen gerichtet zu sein, als auf die einfache Messung der Antikörperlevel im Serum.

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass die semiquantitativen Messungen der slgE - und slgG4 -Antikörper zur Beurteilung des Erfolges einer SIT zwar hilfreich, aber nicht ausreichend sind. Eindeutige Aussagen bezüglich des Outcomes eines Stichereignisses lassen sich weder anhand der Einzelverläufe der spezifischen Immunglobuline noch anhand der Unterscheidungsparameter „geschützt“ und „nicht geschützt“ machen. Vielmehr bleibt für die Zukunft zu diskutieren, welchen Stellenwert Immunoblotuntersuchungen in der Diagnostik und Therapie der Hymenopterenallergie gewinnen werden, wenn rekombinante Allergene routinemässig eingesetzt werden. Dann könnte mittels Westernblotuntersuchungen das genaue Sensibilisierungsmuster jedes einzelnen Patienten bestimmt und dementsprechend ein individueller Extrakt für die SIT zusammengestellt werden. Im Verlauf der SIT könnten Immunoblotuntersuchungen genutzt werden, um zum einen die Ansprechbarkeit einer SIT zu evaluieren, zum anderen, um das Behandlungsregime entsprechend des Auftretens bzw. Nichtauftretens von slgE bzw. IgG4 anzupassen.

8 Literatur- und Quellenverzeichnis

1. Akdis M, Akdis CA. 2007. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*; 119: 780-789.
2. Ashkar S, Weber GF, Panoutsakopoulou V, Sanchirico ME, Jansson M, Zawaideh S, Rittling SR, Denhardt DT, Glimcher MJ, Cantor H. 2000. Eta-1 (osteopontin): An early component of type-1 (cell-mediated) immunity. *Science*, 287: 860-864.
3. Bellinghausen I, Knop J, Saloga J. 2006. Wirkmechanismen der spezifischen Immuntherapie. *Hautarzt*, 57: 855-859.
4. Bilò BM, Ruëff F, Mosbech H, Bonifazi F, Oude-Elberink JNG. 2005. EAACI Position Paper. Diagnosis of Hymenoptera venom allergy. *Allergy*, 60: 1339-1349.
5. Bohle B. 2008. T cell responses during allergen-specific immunotherapy of Type I allergy. *Front Biosci*, 13: 6079-6085.
6. Bonifazi F, Jutel M, Bilò MB, Birnbaum J, Müller U. 2005. EAACI Position Paper. Prevention and treatment of hymenoptera venom allergy. *Allergy*, 60:1459-1470.
7. Birkner T, Rumpold H, Jarolim E, Ebner H, Breitenbach M, Skvaril F, Schreiner O, Kraft D. 1990. Evaluation of immunotherapy-induced changes in specific IgE, IgG and IgG-subclasses in birch pollen allergic patients by means of immunoblotting. Correlation with clinical response. *Allergy*, 45(6): 418-426.
8. Burnette, WN. 1981. Western blotting: electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein. *A Anal Biochem*, 112: 195-203.
9. Burnette WN; Towbin H. 1979. This Week's Citation Classic: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 76: 4350-4354.
10. Chabas D, Baranzini SE, Mitchell D, Bernard CC, Rittling SR, Denhardt DT, Sobel RA, Lock C, Karpuz M, Pedotti R, Heller R, Oksenberg JR, Steinman L. 2001. The influence of the proinflammatory cytokine, osteopontin, on autoimmune demyelinating disease. *Science*, 294: 1731-1735
11. Cooke RA, Bernhard JH, Hebald S, Stull A. 1935. Serological evidence of immunity with coexisting sensitization in hay fever type of human allergy. *J Exp Med*, 62: 733-750.
12. Einarsson R, Inganäs M, Karlsson T, Persson B. 1989. Detection of IgG4-antibodies by immunoblotting in patients on vespid venom immunotherapy. *J Immunol Methods*, 120: 265-269.
13. Flicker S, Valenta R. 2003. Renaissance of the blocking antibody concept in type I allergy. *Int Arch Allergy Immunol*, 132: 13-24.
14. Freising C, Jappe U. 2006. Evaluation des semiquantitativen Westernblots, des CAP-FEIA und des Hauttestes bezüglich der Hymenopterengiftallergie im Hinblick auf die Hyposensibilisierungsbehandlung. *Allergologie*, 29(2): 46-56.
15. Gentlesk MJ, Halpern GM, Mansmann HC. 1987. Long-term IgG4 determinations in hymenoptera-sensitive treated patients. *Ann Allergy*, 59(4): 267-272.
16. Golden DB. 2005. Insect sting allergy and venom immunotherapy: a model and a mystery. *J Allergy Clin Immunol*, 115: 439-447.
17. Golden DB. 2001. Discontinuing venom immunotherapy. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 1:353-356.
18. Golden DB, Kagey-Sobotka A, Lichtenstein LM. 2000. Survey of patients after discontinuing venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 105: 385-390.

19. Golden DB, Kwiterovich KA, Kagey-Sobotka A, Valentine MD, Lichtenstein LM. 1996. Discontinuing venom immunotherapy: outcome after five years. *J Allergy Clin Immunol*, 97: 579-587.
20. Golden DB, Lawrence ID, Hamilton RH, Kagey-Sobotka A, Valentine MD., Lichtenstein LM. 1992. Clinical correlation of the venom-specific IgG antibody level during maintenance venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 90: 386-393.
21. Hipler CH, Bauer A, Schlenvoigt G, Elsner P. 2001. Untersuchungen zur Verlaufskontrolle der Hyposensibilisierung mit Hilfe des Zellantigenstimulationstestes (CAST). *Allergologie*, 1: 9-13
22. Hunt KJ, Valentine MD, Sobotka AK, Benton AW, Amodio FJ, Lichtenstein LM. 1978. A controlled trial of immunotherapy in insect hypersensitivity. *N Engl J Med*, 299: 157-161.
23. Jeannin P, Lecoanet S, Delneste Y, Gauchat JF, Bonnefoy JY. 1998. IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10. *J Immunol*, 160 (7): 3555-3561
24. Jeep S, Wobst B, Paul M, Kunkel G. 2001. Specific IgE, IgG, IgG1, IgG4, IgM und IgA patterns to honeybee venom in nonallergic beekeepers. *Int Rev Allergol Clin Immunol*, 7: 36-41.
25. Jeep S, Paul M, Müller U, Kunkel G. 1996. Honeybee venom allergy: immunoblot studies in allergic patients after immunotherapy and before sting challenge. *Allergy*, 51: 540-546.
26. Kemeny DM, Lessof MH, Patel S, Youlten LJ, Williams A, Lambourn E. 1989. IgG and IgE antibodies immunotherapy with bee and wasp venom. *Int Arch Allergy Appl Immunol*, 88 (1-2): 247-249.
27. Klein-Tebbe J, Bergmann KC, Friedrichs F, Fuchs T, Jung K, Klimek L, Kühr J, Lässig W, Lepp U, Niggemann B, Rakoski J, Rebien W, Renz H, Saloga J, Simon J, Sitter H, Virchow C, Worm M. 2006. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft Allergologie und klinische Immunologie. Die Spezifische Immuntherapie (Hyposensibilisierung) bei IgE-vermittelten allergischen Erkrankung. *Allergo J*, 15: 56-74.
28. Konno S, Golden DB, Schroeder J, Hamilton RG, Lichtenstein LM, Huang S. 2005. Increased expression of osteopontin is associated with long-term bee venom immunotherapy. *J Allergy Clin Immunol*, 115: 1063-1067
29. Lang R, Hawranek T. 2006. Hymenoptera venom immunotherapy and field stings. *J Investig Clin Immunol* 16 (4): 224 -231
30. Lerch E, Müller UR. 1998. Long-term protection after stopping venom immunotherapy: Results of re-stings in 200 patients. *J Allergy Clin Immunol*, 101: 606 – 612.
31. Ludolph-Hauser D, Ruëff F, Fries C, Schöpf P, Pryzbilla B. 1999. Basale Mastzell-Tryptase im Serum und Risiko einer Insektengift-Allergie. *Allergologie*, 22: 53-54.
32. Michels A, Ledent C, Mairesse M, Gossart B, Duchateau J. 1997. Wasp venom immunotherapy changes IgG antibody specificity. *Clin Exp Allergy* 27 (9): 1036 – 1042.
33. Müller UR. 2003. Recent developments and future strategies for immunotherapy of insect venom allergy. *Allergy Clin Immunol*, 3: 299-303.
34. Müller UR. 2002. Recombinant hymenoptera venom allergy. *Allergy*, 57: 570-576.
35. Müller UR, Helbing A, Berchtold E. 1992. Immunotherapy with honeybee venom and yellow jacket venom is different regarding efficacy and safety. *J Allergy Clin Immunol*, 89: 529-535.
36. müller UR, Berchtold E, Helbling A. 1991. Honeybee venom allergy: Results of a sting challenge 1 year after stopping successful venom immunotherapy in 86 patients. *J Allergy Clin Immunol*, 87: 702-709.

37. Müller UR. 1990. Insect sting allergy. Clinical picture, diagnosis and treatment. Stuttgart-New York, Gustav Fischer Verlag.
38. Müller UR. 1989. Klinik, Diagnostik und Therapie der Insektenstichallergie. Schweiz Med Wschr, 119: 1761-1768.
39. Müller UR, Helbling A, Bischof M. 1989. Predictive value of venom specific IgE, IgG and IgG subclass antibodies in patients on immunotherapy with honeybee venom. Allergy, 44: 412-418.
40. Nelson HS. 2007. Allergen immunotherapy: Where is it now?. J Allergy Clin Immunol, 119: 769-777.
41. Noon L. 1911. Prophylactic inoculation against hay fever. Lancet, 1: 1572-1573.
42. Norman PS. 2004. Immunotherapy: 1999-2004. J Allergy Clin Immunol, 113: 1013-1023.
43. Nouri-Aria KT, Wachholz PA, Francis JN, Jacobson MR, Walker SM, Wilcock LK, Staple SQ, Aalberse RC, Till SJ, Durham SR. 2004. Grass Pollen Immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity. J Immunol, 172: 3252 - 3259
44. Ohsima S, Yamaguchi N, Nishioka K, Mima T, Ishii T, Umeshita-Sasai M, Kobayashi H, Shimizu M, Katada Y, Wakitani S, Murata N, Nomura S, Matsuno H, Katayama R, Kon S, Inobe M, Uede T, Kawasw I, Saeki Y. 2002. Enhanced local production of osteopontin in rheumatoid joints. J Rheumatol, 29: 2061-2067
45. Ollert M, Ring J. 1999. Prognostische Bedeutung von Immunoblot-Untersuchungen bei Hymenoptereingift-Allergie. Allergologie, 22 (2): 78-79.
46. Pereira Santos MC, Pedro E, Spinola Santos A, Branco Ferreira M, Palma Carlos ML, Palma Carlos AG. 2005. Immunoblot studies in allergic patients to hymenoptera venom before and during immunotherapy. Allerg Immunol, 37(7): 273-278.
47. Przybilla B, Müller U, Reinhart J, Ruëff F. 2004. Erhöhte basale Serumtryptasekonzentration oder Mastozytose als Risikofaktor der Hymenoptereingiftallergie. Allergo J, 13: 440 – 442.
48. Przybilla B, Ruëff F, Fuchs T, Pfeiffer C, Rakoski J, Stolz W, Vieluf D. 2004. Insektengiftallergie. Leitlinien der Deutschen Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie (DGAI). Allergo J, 13: 186-190.
49. Przybilla B, Ruëff F. 1999. Hyposensibilisierung der Hymenoptereingiftallergie. Wien Med Wochenschr, 14/15: 421-428.
50. Przybilla B. 1995. Bienen- und Wespengiftallergie. HNO, 43: 451-462.
51. Randolph CC, Reisman RE. 1986. Evaluation of decline in serum venom-specific IgE as a criterion for stopping venom immunotherapy. J Allergy Clin Immunol, 77: 823-827.
52. Reimers A, Müller U. 2002. Labordiagnostik bei der Insektengift-Allergie. J Lab Med, 26 (3/4): 115-119.
53. Reisman RE. 1993. Duration of venom immunotherapy: relationship to the severity of symptoms of initial insect sting anaphylaxis. J Allergy Clin Immunol, 92: 831-836.
54. Reisman RE, De Masi JM. 1989. Relationship of serum venom-specific IgE titers to clinical aspects of stinging insect allergy. Int Arch Allergy Appl Immunol, 89: 67-70.
55. Reisman RE, Lanter R. 1989. Further observations of stopping venom immunotherapy: Comparison of patients stopped because of a fall in serum venom-specific IgE to insignificant levels with patients stopped by self-choice. J Allergy Clin Immunol, 83: 1049-1054

56. Renz H, Becker W-M, Bufe A, Klein-Tebbe J, Raulf-Heimsoth M, Saloga J, Werfel T, Worm M. 2002. In-vitro-Allergiediagnostik. *Allergo J*, 11:492-506
57. Robinson DS, Larché M, Durham SR. 2004. Tregs and allergic disease. *J Clin Invest*, 114: 1389-1397.
58. Ross RN, Nelson HS, Finegold I. 2000. Effectiveness of specific immunotherapy in the treatment of hymenoptera venom hypersensitivity: a metaanalysis. *Clin Ther*, 22: 351-358.
59. Röver AC. 2001. Phänotypische und funktionelle Charakterisierung peripherer B-Zellen während Wespengiftimmuntherapie [Dissertationsschrift]. Berlin: Humboldt-Universität
60. Rüeff F, Przybilla B, Müller U, Mosbech H. 1996. The sting challenge test in Hymenoptera venom allergy. *Allergy*, 51: 216-25.
61. Senti G, Johansen P, Oliver R, Prinz Vavricka B, Graf N, Wüthrich B, Kündig T. 2006. A cutaneous allergen neutralisation test that correlates with the duration of venom immunotherapy. *Int Arch Allergy Immunol*, 141: 377-383.
62. Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 76: 4350-4354.
63. Urbanek R, Kemeny DM, Richards D. 1986. Subclass of IgG anti-bee venom immunotherapy and its relationship to longterm protection from bee stings and following termination of venom immunotherapy. *Clin Allergy*, 16: 317-322.
64. Wachholz PA, Durham SR. 2004. Mechanisms of immunotherapy: IgG revisited. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 4(4): 313-318.
65. Wilson AB, Deighton J, Lachmann PJ, Ewan PW. 1994. A comparative study of IgG subclasses antibodies in patients allergic to wasp or bee venom. *Allergy*, 4: 272-280.
66. Van Neerven RJ, Wikborg T, Lund G, Jacobsen B, Brinch-Nielsen A, Arnved J, Ipsen H. 1999. Blocking antibodies induced by specific allergy vaccination prevent the activity of CD4+ T cells by inhibiting serum-IgE-facilitated allergen presentation. *J Immunol*, 163 (5): 2944 – 2952.
67. v. Pirquet C. 1906. Allergie. *Münch Med Wochenschr*, 30: 1457-1458.

9 Anhang

9.1 Danksagung

Für die Vergabe des Themas, die konstruktive Anleitung und gute Betreuung danke ich Herrn Prof. Dr. med. P. Elsner, Direktor der Klinik für Hautkrankheiten der FSU Jena und Frau PD Dr. rer. nat. U.-C. Hipler, Laborleiterin oben genannter Klinik, als Mentorin.

Besonderer Dank gilt Frau Wüthrich, MTA der Klinik, die den Grossteil der Teste durchführte und mir bei vielen Fragen zur Seite stand.

Für die statistische Beratung danke ich Herrn Prof. Dr. em. Hans Riedwyl, Philosophisch-naturwissenschaftliche Fakultät der Universität Bern.

Ausserdem danke ich meiner Familie und meinen Freunden für ihre stete Unterstützung und Geduld.

9.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskriptes unterstützt haben: keine

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für die Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Solothurn, den 14.02.2009

Thekla Renker